

UNIVERSIDAD DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS DOCTORAL

Producción de ácido fumárico por fermentación

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Concepción Llaguno Marchena

DIRECTOR:

José Garrido Márquez

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5322354754

T1

66.0

LLA

616504136

835059357

PRODUCCION DE ACIDO FUMARICO POR FERMENTACION

TESIS DOCTORAL

presentada por

CONCEPCION LLAGUNO MARCHENA.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE - MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

BIBLIOTECA

Nº Registro ...33330.....

DEPARTAMENTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES

PATRONATO JUAN DE LA CIERVA DE INVESTIGACION TECNICA.

- 1.959 -

Agradesco profundamente al Director del Instituto de Química Aplicada D. Manuel Lora Tamayo, el interés demostrado a lo largo de esta Tesis, y al Dr. D. José Garrido Marques, Director del DEPARTAMENTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES, mi sincero reconocimiento, pues sin su acertada dirección, su ciencia y constante estímulo, no hubiera sido posible la realización de la misma. Al DEPARTAMENTO DE FERMENTACIONES INDUSTRIALES, por su prestación de material de laboratorio, aparatos y cuanto fué necesario para llevar a cabo el presente trabajo.

Jose Garrido Marques

INDICE
=====

	Página
INTRODUCCION.	1
MATERIAL, METODOS DE TRABAJO Y ANALISIS	6
CAPITULO I.- Influencia de elementos trazas.	
Parte teórica	16
Parte experimental	23
CAPITULO II.- Influencia de la concentración de fosfato.	
Parte teórica	37
Parte experimental	42
CAPITULO III.- Influencia de los neutralizantes	
Parte teórica	58
Parte experimental	63
CAPITULO IV.- Influencia de la concentración de sulfato amónico y otras sales nitrogenadas	
Parte teórica	85
Parte experimental	90
CAPITULO V.- Influencia de la agitación y aireación	
Parte teórica	114
Parte experimental	122
CAPITULO VI.- Formación de fumárico y metabolitos identificados por cromatografía	
Parte Teórica	140
Parte experimental	148
CONCLUSIONES	167
BIBLIOGRAFIA	175

INTRODUCCION.

El primer ácido insaturado que se aisló como producto del metabolismo hidrocarbonado de un microorganismo, fué el ácido fumárico y dicho descubrimiento se debe a Erlich que en 1.911 (19) y en cultivos de *Rh. nigricans* (*Mucor stolonifer*) pudo identificarlo como principal producto de degradación de la glucosa.

Hasta ahora y quizá por falta de investigación en este sentido, los mohos productores de ácido fumárico pertenecen casi exclusivamente a la familia de los Mucorales y las mejores cepas productoras al género *Rhizopus*.

No obstante, y por su valor histórico hemos de citar los trabajos de Wehmer (92) con un *Aspergillus*, al cual por sus extraordinarios rendimientos en fumárico (70% de carbohidrato consumido) se le dió el nombre de *Aspergillus fumarius*. Después de diez años de cultivo en el laboratorio, mediante conservación en tubos de ensayo, perdió la capacidad de transformar la glucosa en fumárico y comenzó a producir, como la mayoría de los *Aspergillus*, ácidos cítrico y glucónico. (93).

Esto es un excelente ejemplo de la degeneración o variación fisiológica que un prolongado almacenamiento, en condiciones de laboratorio, pueden producir en un microorganismo buen productor del ácido de que se trate.

Los microorganismos productores de ácido fumárico perte-

necen en su gran mayoría a la clase de los Ficomycetos, sub-clase Zigomicetos, Familia Mucorales.

Hay pocos mohos, fuera de la Familia de los Mucorales que produzcan ácido fumárico.

Realmente esta propiedad de producir ácido fumárico en cantidad apreciable, es común a varios géneros de la Familia Mucorales; se ha encontrado ácido fumárico en cultivos de Mucor, Cunninghamella y Circinella, aunque no en todas las especies de estos géneros (22).

También se encontraron pequeñas cantidades de dicho ácido en otros géneros como en algunas cepas de Penicillium griseofulvum (63), en Aspergillus glaucus (80), Aspergillus Fulvum, A. oniki y A. wentii (81) y también en Caldariomyces fumago (13).

En el género Rhizopus, al que pertenece la cepa usada por Erlich en sus trabajos de 1911, se encuentran algunos microor ganismos cuya capacidad para la producción de ácido fumárico a partir de sustratos hidrocarbonados varía ampliamente. Los investigadores japoneses Takahashi y Sakaguchi (83) dividie ron al género Rhizopus, en tres categorías:

- a) los que forman más ácido fumárico que láctico
- b) los que producen ácido láctico en mayor cantidad que ácido fumárico y
- c) los que forman ácidos láctico y fumárico en cantidades va-

riables.

Aún entre cepas productoras de ácido fumárico en cantidades importantes, existen notables diferencias fisiológicas que fueron observadas por Foster y Waksman (22) en un estudio sobre diez cepas de *Rh. nigricans*.

Esta especificidad de las cepas, es un hecho muy importante a tener en cuenta estudiando estos microorganismos, porque explica la mayor parte de las contradicciones y diferencias en su respuesta a la influencia de elementos trazas, concentración de fosfatos, etc. La especificidad, según Foster y Waksman, va ligada al sexo de la cepa utilizada. La cepa macho (+) es activa productora de ácido fumárico, mientras que la cepa hembra (-) no produce ni siquiera trazas.

El ácido fumárico tiene interés tanto por sus aplicaciones industriales, como materia prima de plásticos, barnices, tintas de imprenta, etc, como por su papel de intermediario en el metabolismo aerobio de los hidratos de carbono, que le da, asimismo, gran importancia desde el punto de vista bioquímico.

El trabajo presentado en esta Tesis se dirige fundamentalmente al estudio de la producción de ácido fumárico y en los primeros Capítulos, se presentan los ensayos relacionados con ella que pueden servir de base a su fabricación.

En relación con la producción de ácido fumárico, nuestros ensayos comenzaron en cultivo superficial, variando las concenen

traciones de los distintos componentes del medio original, - empleado por J. M^e Garrido (30) en la producción de grasas por mohos. Sin embargo, el cultivo sumergido es el verdaderamente aplicable en escala industrial y, como en la bibliografía consultada no se encontraron rendimientos interesantes en cuanto a cantidad y duración del proceso, ni comparables a los obtenidos en cultivo superficial, reduciéndose según Foster (21) toda la información sobre cultivo sumergido a las patentes de Waksman (90), Kane, Finlay, Amann (36) a las que debemos - agregar los trabajos de la escuela de Bernhauer (6, 7, 8, 54), nuestro estudio tuvo por finalidad fijar las condiciones óptimas del cultivo sumergido, tanto en relación a la composición química del medio (concentración de hidratos de carbono, de sulfato amónico, de fosfato, relación C/N, hierro y cinc como elementos trazas, etc.) como en lo referente a las mejores con condiciones físicas de aireación, agitación, y sobre todo, por - ser un extremo importante, la calidad y cantidad del neutralizante usado en este proceso, de tanto interés para la producción industrial del ácido fumárico.

Esta serie de ensayos dieron por resultado un medio de - cultivo, en el que la cepa *Rhizopus oryzae* Went y Prinsen Geerlings que utilizamos en esta Tesis, logró en el mínimo tiempo, la máxima conversión de glucosa en ácido fumárico, en las condiciones propias del cultivo sumergido.

Los Capítulos I al IV, están dedicados por consiguiente, a detallar las experiencias realizadas con distintas concentraciones de sulfatos férrico y de cinc, de fosfato monosódico, de sulfato amónico y otras sales nitrogenadas, así como la concentración y tipo de los neutralizantes. El Capítulo V se dedica al estudio de los problemas planteados por la aireación y agitación del medio de cultivo.

Todos los ensayos se efectuaron en cultivo superficial y sumergido, empleando material de laboratorio o bien en planta piloto con fermentadores de acero inoxidable de tipo industrial.

En el Capítulo VI, después de revisar las actuales teorías de formación de ácido fumárico, se llevan a cabo diversos ensayos en los que tratamos de poner de manifiesto las posibles vías de formación del ácido fumárico, estudiando mediante técnicas cromatográficas, algunos productos intermedios de estos mecanismos metabólicos.

MATERIAL, METODOS DE TRABAJO Y ANALISIS
EN CULTIVO SUPERFICIAL Y SUMERGIDO

Morfología de la cepa utilizada.— Los mohos de la familia de los Mucorales, a que pertenece la cepa usada en los estudios que se detallan a continuación, tienen micelio unicelular aunque contiene varios núcleos, las hifas antiguas y las hifas portadoras de los órganos de reproducción, están a menudo separadas. Este micelio, crece parcialmente sumergido en el medio de cultivo y cuando empieza a diferenciarse, produce tres tipos de hifas: los rizoides, que dan nombre al género, los estolones, que crecen horizontalmente y sujetan haces de rizoides y finalmente, los esporangioforos que crecen a partir de los estolones en el lugar en que se forman también los rizoides. Las hifas aéreas dan a estos micelios aspecto blanco algodónoso. Las esporas, diminutas, son negras.

Cuando se cultivan en condiciones anaerobias, se observan formas esferoidales semejantes a levaduras, produciéndose en estos casos alcohol etílico y CO_2 .

La reproducción asexual tiene lugar por medio de endosporas formadas en los esporangios. En el género *Rhizopus*, los esporangioforos (portadores de esporas), son característicamente alargados.

La reproducción sexual, se verifica mediante zigosporas. Esto ocurre frecuentemente en cultivos de laboratorio aunque también se observa a veces en especies naturales.

Los mucorales están ampliamente distribuidos y aparecen comunmente en el aire, el suelo y ciertas partes de los vegetales. El género *Rhizopus* es uno de los más estudiados, existen cerca de 35 especies, todas saprofitas.

La cepa que empleamos, es la *Rhizopus Oryzae* Went y Prinsen Geerligg, utilizada por Butkewistch, procedente del Centraalbureau voor Schimmelcultures, de Baarn (Holanda). Es muy semejante al *Rhizopus nigricans*, del que difiere en esporangios de menor tamaño y la frecuente formación de clamidosporas. Crece bien entre 30-40°C, convierte fácilmente el almidón en glucosa por hidrólisis. Fermenta la fructosa, galactosa, manosa, maltosa y rafinosa en poca cantidad. Su poder para hidrolizar almidón se emplea en la fabricación de aguardiente.

Se subcultiva en tubos de agar-malta (2 % de agar-agar y 6 % de malta) dispuestos en pico de flauta. Para prevenir degeneraciones se mantienen esporas en tierra estéril.

Composición del medio original.

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na.2H}_2\text{O}$	0,018 grs/100 cc.	
$\text{SO}_4\text{Mg.7H}_2\text{O}$	0,006	id.
SO_4K_2	0,0055	id.
$\text{SO}_4\text{Zn.7H}_2\text{O}$	0,0013	id.
$\text{Cl}_3\text{Fe.6H}_2\text{O}$	0,0040	id.
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	0,20	id.
glucosa	9,0	id.

Condiciones de cultivo.- Los métodos de cultivo que se conocen como superficial y sumergido, tienen respectivamente, las siguientes particularidades:

Se entiende por cultivo superficial cuando el moho crece sobre la superficie del medio de cultivo, desarrollando un micelio que cubre dicha superficie y establece condiciones diferentes para las células superficiales, hifas aéreas y las células que están en contacto con el medio de cultivo. Este tipo de cultivo de microorganismos, llamado también estacionario, supone que el moho crezca exclusivamente en la zona superior del medio y crea por tanto, problemas de difusión de los productos excretados por la actividad celular, de ósmosis según la concentración de sales y azúcar que llegan a cada capa de células, de transporte de oxígeno, por la respiración celular

desde la atmósfera hasta las capas profundas de células, etc.

Los microorganismos cultivados en las condiciones anteriormente descritos, presentan también aspecto diferente según la edad, el medio de cultivo, temperatura, pH. La esporulación, un fenómeno que no se da en cultivo sumergido, hace cambiar el color del micelio y detiene en muchos casos, la producción de ciertas sustancias.

Los valores de las tablas correspondientes a cultivos superficiales que aparecen en esta Tesis, resultan de los datos conjuntos de cuatro matraces, vidrio Belgor, de 100 cc de capacidad, con 25 cc de medio de cultivo, cada uno.

La adición de agente neutralizante, que se detalla en cada caso, se hace bien en el momento de la inoculación, o a los tres días de desarrollo, cuando el micelio comienza a cubrir la superficie. Los matraces se agitan desde entonces, dos veces al día suavemente, para poner en contacto el neutralizante con todo el medio, ya que de lo contrario, se deposita enseguida, en el fondo del matraz. En esta suave agitación hay que cuidar, no hundir ni estropear la capa miceliar.

Los matraces, tapados con algodón estéril, se mantienen en una cámara estufa durante el período de incubación, que se señala en cada ensayo y que varía entre 10 y 12 días, a una temperatura de 34°C.

Condiciones de cultivo.sumergido.- En el cultivo sumergido,

todas las células del micelio están en estrecho contacto con el medio de cultivo; esto favorece la utilización del sustrato por que actúa toda la capacidad enzimática de la masa miceliar pro-ducida, pero crea problemas de aireación y agitación que, en ca-da caso, han de resolverse para que la fermentación en estas condiciones, no sea absolutamente anaerobia. El cultivo sumer-gido tiene muchas ventajas sobre el cultivo superficial, porque mientras éste ha de verificarse en bandejas de gran superficie y que contienen poco volumen de medio a fermentar, condición necesaria para que todo el medio sufra la acción enzimática del micelio, en el cultivo sumergido con agitación, grandes volúmenes de medio se ponen constantemente, en contacto con las células del mohe y, de esta manera, pueden fermentarse cantidades mayores de sustrato en un tiempo mucho más breve. La agitación puede hacerse mediante paletas rotatorias o procurando que la corriente de aire introducida en el medio, provoque un movimien-to adecuado. Otro procedimiento consiste, en acoplar los reci-pientes con el medio de cultivo, en bandejas rotatorias que imprimen movimiento circular al líquido, facilitando la aireación del mismo a través de algodón que sirve de tapón.

Los valores presentados en las Tablas, corresponden a tres tipos de recipientes:

Se utilizaron, como se detalla en cada ensayo, matraces de vidrio Pyrex de 500 cc de capacidad, con 100 cc de medio de

cultivo, tapados con algodón estéril y colocados en un agitador-bandeja que dá 72 r.p.m.; recipientes de vidrio especialmente diseñados por nosotros (véase fig 1) que tapados con especiales tapas de vidrio, pergamino o algodón se colocaron así mismo en el citado agitador-bandeja.

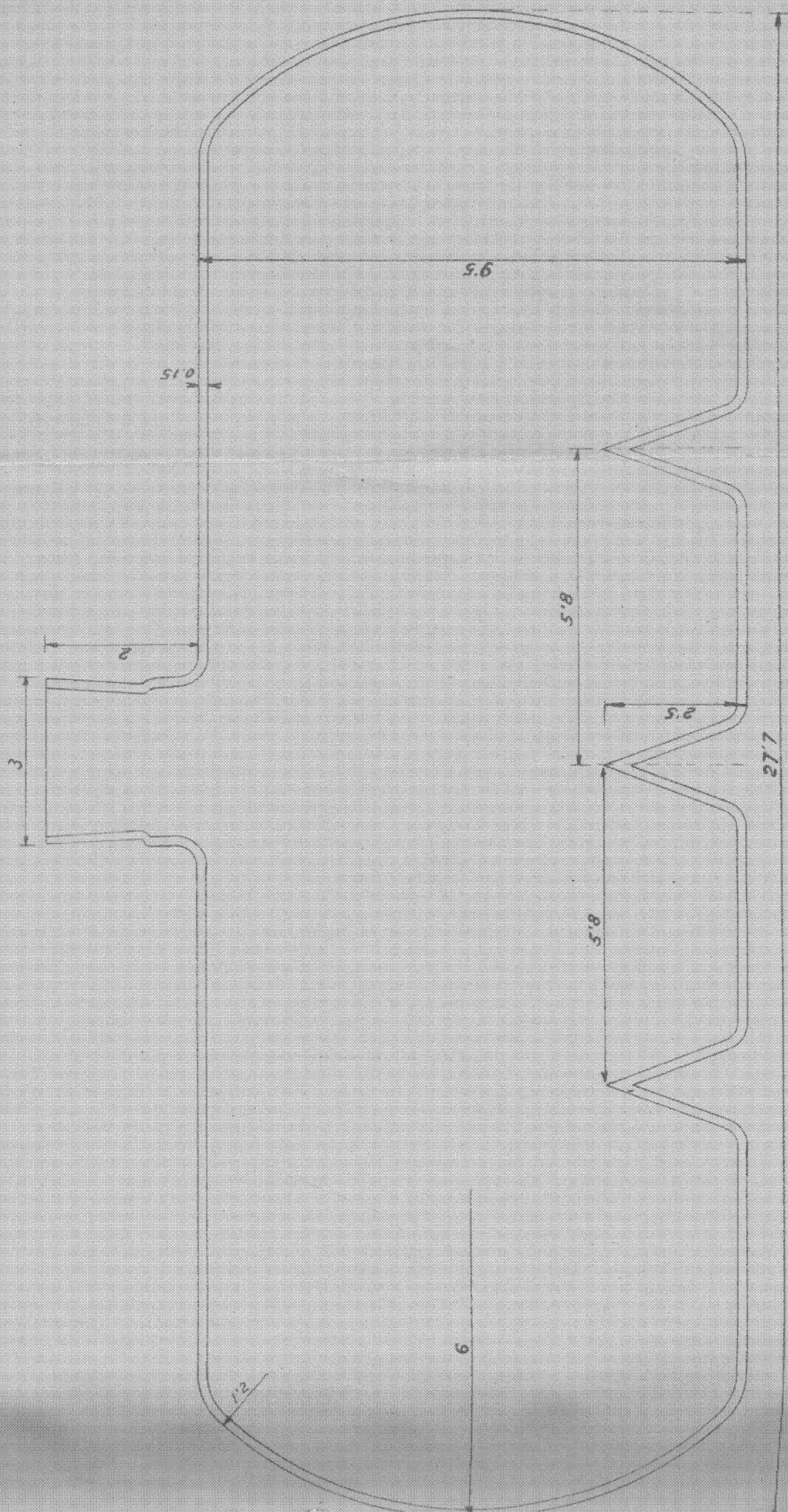
En planta-piloto, fermentadores de acero inoxidable, de 30 y 100 litros de capacidad total, que van dotados de un dispositivo de agitación mecánica y aireación mediante ~~pase~~ de una corriente de aire estéril, a razón de 0,25 litros de aire por minuto y litro de medio.

En cultivo sumergido, la temperatura interior de los fermentadores y del agitador-bandeja, se mantuvo en todos los casos a 34°C.

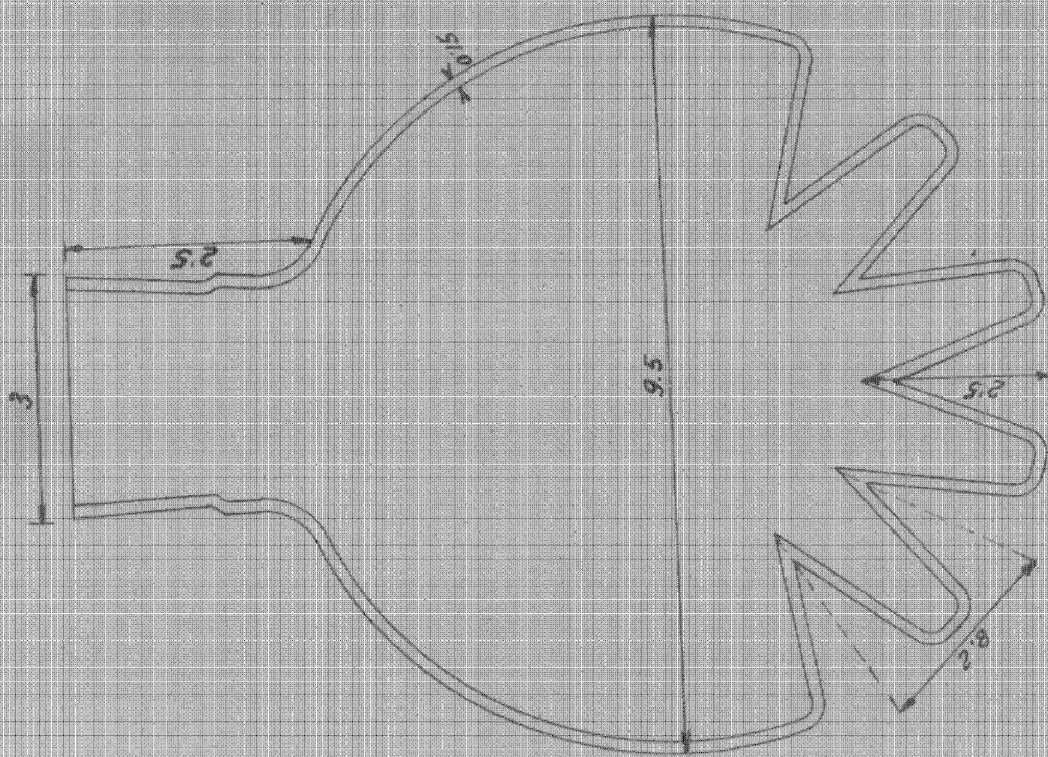
Neutralizantes.-- Un extremo importante para la producción de ácido fumárico, se refiere al pH del medio, que ha de mantenerse durante todo el proceso de consumo y transformación de glucosa, en valores comprendidos entre 4 y 6.

En efecto, al comenzar la producción de ácido, el pH ~~des-~~ciende y así ~~inhibe~~ la producción desviando el metabolismo de la glucosa e impidiendo el desarrollo normal del moho. La elección del neutralizante es de capital importancia. Debe tener un límite de impurezas que no influyan notablemente en la composición óptima del medio de cultivo, no conviene que suba el pH a valores superiores a los establecidos como óptimos, su

Sección longitudinal



Escala natural



Escola natural

FIGURA Nº 1

Vista general

solubilidad tiene que ser suficiente para ir neutralizando el ácido según se forma y sustraerlo de este modo a una posterior descomposición, debe tener, en fin una composición química que no altere las condiciones establecidas antes de añadirlo.

La influencia de estas condiciones en la producción de ácido fumárico y el desarrollo del moho, forman un Capítulo de esta Tesis, en que hemos conseguido un tipo de neutralizante que satisface todas ellas y con el que se han logrado satisfactorios rendimientos.

Análisis cuantitativo del ácido fumárico.- El ácido fumárico se determina cuantitativamente por el método de Hahn y Haarman modificado por Arne Olander (59) y que consiste en una gravimetría del precipitado de fumarato mercurioso obtenido mediante el reactivo de nitrato mercurioso.

Análisis cualitativo de ácido fumárico y otros ácidos presentes.- Los ácidos producidos en el metabolismo del moho se determinan cualitativamente mediante cromatografía en papel.

Se han usado distintas técnicas para la determinación de ácidos libres, la de Lugg y Overell (51), después de eliminar los cationes por columnas de resinas cambiadoras de ion, Zerolit 225 (Amberlita IR 120) (Dowex 50. El revelado de estos cromatogramas se lleva a cabo con azul de bromofenol y cuando se trata de comprobar la presencia de cetoácidos se utiliza el revelado con 2-4-dinitrofenilhidrazina (2 grs. de 2-4-DFNH

en 1 litro de HCl 2N).

Los métodos reseñados en el trabajo de Wood y Bender (98) se emplearon así mismo para la cromatografía de ácidos libres. El de Cheftel, Manier y Macheboeuf (16) con papel Whatmann nº 4, ascendente, etanol-solución acuosa de amoníaco ($d=0,880$)-agua, 80-5-15 ó n-butanol-acético-agua, 60-15-25.

Para la específica determinación de cetoácidos se emplearon los de Kun y García-Hernández (46) sobre papel Whatmann nº 1, previamente tratado con buffer de fosfato 0,1 M. pH=7,3 descendente, con etanol-agua, 83-17, en atmósfera de etanol al - 95 %.

El Hawary y Thomson (18) con n-butanol-etanol-amoniaco 5 % 70-10-20, ascendente, sobre papel Whatmann nº. 4.

Cavallini y Prontali (12) con n-butanol-etanol-agua, 40-10-50, descendente, sobre papel Schleider-Schüll nº 2043.

Sykera y Prohaska (82) con Whatmann nº 1, descendente, eter de petroleo-etanol 95%, 20-80, que permite distinguir las 2-4-dinitrofenilhidrazonas de cetoácidos y compuestos aldehídicos o cetónicos de carácter neutro.

Estos métodos de análisis de cetoácidos suponen una precipitación previa de las correspondientes 2-4-dinitrofenilhidrazonas.

Análisis de materia reductora.- Las concentraciones iniciales y finales de sustancias reductoras en el medio de cultivo se

determinan por el método de Schaffer-Semegyí (69).

Materia seca.- Los micelios en ambos tipos de cultivo, se calientan hasta ebullición con una concentración de ácido nítrico suficiente para liberar el fumárico que hubiera combinado como sal cálcica. El fumárico que precipita se disuelve al calentar. Se lavan varias veces dichos micelios con agua caliente y se filtra el medio de cultivo añadiendo las aguas de lavado. Se completan a un volumen determinado para los análisis descritos y los micelios se secan en estufa a 80°C. y después se pesan.

Nitrógeno-formol.- A 20 cc. de medio de cultivo neutralizados con sosa 0,1 N con indicador de fenolftaleína, se agregan 5 cc. de formol al 40 % diluido dos veces y convenientemente neutralizado. Ambas porciones se mezclan y se valora la acidez resultante en la reacción con NaOH 0,1N en presencia de fenolftaleina.

Los cc. de NaOH 0,1N gastados en esta segunda neutralización, indican el número N/formol y con ello la concentración en sales amoniacales del medio de cultivo.

Recuperación.- La recuperación del ácido formado en los medios de cultivo, después del desarrollo del moho, se hace con mucha facilidad. El fumarato cálcico llega a precipitar, porque su solubilidad es aproximadamente 2,5 por ciento a 30°C, y en nuestros cultivos se produce en mayores cantidades. El ácido fu

márico es bastante insoluble (0,7 grs/100 a 25°C) y se separa fácilmente al añadir ácido clorhídrico o nítrico que forman sales cálcicas solubles. El ácido libre se cristaliza a partir de las soluciones acuosas calientes. Funde a 288°C y cristaliza en prismas monoclinicos incoloros.

CAPITULO I

Parte teórica.

INFLUENCIA DE LOS ELEMENTOS TRAZAS

Ciertas sales metálicas tienen gran importancia en la nutrición de los mohos, tanta como los hidratos de carbono, las sales nitrogenadas o los fosfatos. Sin embargo, son necesarias en tan pequeñas cantidades que, en el lenguaje microbiológico se les denomina "elementos traza" y entre ellos suelen ser los mejor estudiados los cationes de Fe y Zn.

En medios sintéticos es donde pueden observarse con éxito las influencias que los cationes de metales pesados tienen en el crecimiento y desarrollo de distintas especies de Fungi. Los primeros estudios en este sentido se deben a Raulin (64) que en 1869, demostró que el *Aspergillus niger* necesitaba para su completa nutrición, además de las sales habitualmente suministradas, las que aparecían en las cenizas de su propio micelio es decir, hierro, cinc, silicio y posiblemente manganeso.

Estas ideas de Raulin fueron refutadas posteriormente por Coupin (15), Lepierre (47), Wehmer (94), pero sirvieron entonces para estimular los estudios de la escuela de Pfeffer, quien en 1895 impresionado por las mínimas cantidades necesarias para provocar un gran desarrollo en el crecimiento de los fungi, comparados con los cultivos con sales standard empleadas comúnmente por los investigadores de la fisiología de las plantas, llegó a la conclusión de que las sales de metales pesados eran

activas a través de lo que él llamó estímulo químico (chemical stimulation). Esta idea tenía relación con el efecto estimulante ejercido sobre células animales por venenos orgánicos (56) y también con el "efecto oligodinámico" que establece cómo venenos muy activos pueden actuar como estimulantes si se suministran al organismo en pequeñísimas dosis. Pfeffer suponía que el efecto estimulante era la respuesta del organismo al efecto venenoso de los metales pesados.

Pero las ideas de Pfeffer partían de un supuesto falso, creer que solamente había metales pesados (Fe, Zn, Cu, etc.) en los cultivos preparados con dichas sales y suponer libres de ellos otros cultivos usados como testigos. Pero es fácil comprender que aún en reactivos bastante puros existe un grado de impurezas que basta para conseguir un determinado crecimiento y esto no era tenido en cuenta por Pfeffer (61).

Steinberg (76), Bortels (9), y Roberg (65) confirmaron las ideas de Raulin en lo referente a las necesidades de Zn y Fe para el desarrollo de los mohos estudiados y hallaron que si algunos de estos dos elementos desaparecía totalmente del medio de cultivo, no se producía ningún desarrollo. Desde 1919 Steinberg comenzó a perfeccionar una técnica de purificación de medios de cultivo en orden a suprimir por completo las impurezas de cationes pesados, como único método posible para estudiar con certeza su verdadera influencia respecto a su exacta-

mente conocida concentración. Este método de purificación consiste en calentar en autoclave durante veinte minutos a la presión de una atmósfera (120,5°C) la solución completa, con 15 gramos de carbonato cálcico/litro.

Después se deja reposar durante toda una noche, se decanta para separar el sedimento donde se han precipitado los cationes pesados y el filtrado, libre por tanto de dichos cationes se distribuye en los erlenmeyer destinados al cultivo del moho. En su estudio (77) indica también la utilización de carbonato magnésico y carbón activo como agentes precipitantes de metales pesados. Sus ensayos sobre *Aspergillus niger* (76) continúan en el trabajo anteriormente citado, por la extracción de las esporas con álcali diluido ya que el pigmento negro (aspergilina) contiene Fe y es soluble en álcali diluido. Con estas precauciones y el uso de material de cuarzo en algunos ensayos, Steinberg pudo refutar las ideas de Pfeffer y definió la acción del Fe y el Zn, como la de cualquier necesario nutriente y no como un estimulante químico.

Existen otras técnicas de purificación como la usada por Molliard (55) haciendo crecer *A. niger* sobre el medio a purificar.

Actualmente se considera a los cationes pesados solamente como nutrientes, pero de su sorprendente influencia sobre el desarrollo de los mohos, algas y otros microorganismos es-

tudiados (35) puede deducirse una acción particular y específica. La moderna bioquímica permite establecer relaciones entre ese efecto y su presencia en enzimas y coenzimas que actúan en diversos tipos de metabolismo. Es decir, puede suponerse con razón que deben su excepcional efecto a la condición de biocatalizadores indirectos actuando a través de distintas enzimas. Por ejemplo; las enzimas conteniendo hierro son entre otras las siguientes: catalasas, peroxidasas, citocromos entre las más importantes.

Las enzimas que contienen Zn, entre otras son las anhidrasas carbónicas.

La mayoría de los trabajos aparecidos sobre la influencia de los elementos trazas se han efectuado sobre cepas de *A.niger* (91) donde se comprobó que el efecto del Zn no es el mismo sobre diferentes cepas de *A.niger* y sugirió incluso un método de caracterización de cepas basado en esta peculiar reactividad frente al Zn.

Unos de los primeros en ocuparse de la acción de los elementos trazas sobre el crecimiento de los mohos del género *Rhizopus*, fueron Mc Hargue y Calfee (53) que comprobaron el aumento del crecimiento en cultivos de *Rh nigricans* en que se añadía Zn asociado a *Cy Mn*.

En 1936, Lockwood, Ward y May (50) ensayando cepas de *Rhizopus cryzae* productoras de ácido láctico, comprobaron asi-

mismo la influencia del Zn en la fisiología de dichas cepas.

Waksman y Foster (89) fijan su atención sobre los cationes Fe y Zn y deducen de sus ensayos que el efecto de Zn sobre el desarrollo y producción del *Rhizopus* es de tipo netamente funcional y catalítico. El consumo de glucosa es más completo en presencia de Zn, pero en cambio disminuye la producción de ácido fumárico. Por tanto, la mayor parte de la glucosa consumida se emplea en la síntesis de materia celular y en la producción de energía. Al mismo tiempo aparece en sus cultivos un nuevo ácido que parece debido a la acción del Zn y que hace pensar en una alteración de los procesos metabólicos. Todo lo anterior hace afirmar a dichos autores que el Zn es un catalizador biológico, el más activo entre todos los metales pesados ensayados, (Fe, Cu, Mb, Mn, etc.)

El papel del Fe en el metabolismo de *Rhizopus nigricans* se describe por Foster y Waksman (23) como totalmente opuesto al del Zn, siendo las concentraciones de glucosa del medio de cultivo, las que prácticamente gobiernan la influencia mutua de ambos cationes.

Las concentraciones de glucosa del 10 por ciento son las más favorables para observar la máxima respuesta a la acción del Zn. Concentraciones hasta el 20 por ciento conducen a efectos antagónicos entre Fe y Zn, mientras que concentraciones superiores dan lugar a un efecto asociativo.

Sin embargo las experiencias de Bernhauer y Thole (5) son contradictorias respecto a las anteriores, en cuanto al efecto del Zn para la producción de fumárico por su cepa Rh. nigricans. La adición de 0,005 grs/100 de SO_4Zn aumenta el rendimiento en fumárico hasta el 41,6 por ciento.

En el trabajo de Miksch, Rauch, Mielke-Miksch y Bernhauer (54) sobre la influencia de Zn, Fe, Mn y Cu las concentraciones utilizadas son:

1 mgr/100 de $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 a 4 mgrs/100 de $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,3 a 1,2 mgrs/100 de $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 1 a 5 mgrs/100 de SO_4Mn .

La óptima producción de fumárico (60,8 por ciento) se consigue con una concentración de 0,6 mgrs/100 de sulfato cúprico sin adición de Zn, porque la presencia de 1 mgr/100 de sulfato de cinc rebaja el rendimiento a 34,8 por ciento. El efecto inhibitorio de altas concentraciones de sal de cobre (1,2mgrs. por ciento) se ejerce en ausencia de cinc, porque cuando se añade sulfato de cinc en concentraciones de 1 mgrs/100 se amortigua el efecto inhibitorio y los rendimientos se elevan desde 13,1 % en ausencia de Zn a 40,6 % si el Zn está presente en la concentración indicada.

Con objeto de aportar nuevas observaciones a la influencia de las sales Zn y Fe. en el desarrollo de *Rhizopus oryzae* Went et Prinsen Geerlingse y a la obtención de fumárico en cultivos de dicho microorganismo, se plantearon los ensayos de es

ta tesis que se presentan en el Capítulo 1º.

Las condiciones varían notablemente entre cultivo superficial y sumergido, advirtiéndose en éste último la importancia de la agitación y la consiguiente aireación del medio de cultivo.

Hemos comprobado en nuestra Tesis el efecto tóxico de altas concentraciones de sales de Fe. y Zn., su antagonismo, la especial resistencia de nuestra cepa a altas concentraciones de dichos cationes y su influjo sobre la producción de fumárico.

PARTE EXPERIMENTAL.

1ª. serie experimental..- Variaciones en la concentración de sal de hierro. (1).

El medio inicial utilizado por José M^a Garrido (30), se modifica sustituyendo el cloruro férrico por una concentración equivalente de sulfato férrico (0,20 grs/litro) manteniendo - constantemente todas las sales restantes.

En cultivo superficial se ensayan seis concentraciones distintas de sulfato férrico con objeto de fijar la concentración más conveniente para la producción de fumárico.

Los resultados de este ensayo se encuentran en la Tabla I.

Las concentraciones ensayadas son: 0, 0,025, 0,05, 0,1, 0,4 y 0,8 grs./litro.

A los tres días de inoculado se añaden 5 gramos de carbonato cálcico estéril por cada 100 cc. de medio en matraces Belgor de 100 cc. de capacidad con 25 cc. de medio de cultivo.

Temperatura de incubación 30°C.

(1) Las concentraciones de las sales de hierro y cinc que se utilizan en los ensayos de este Capítulo y siguientes, no son valores absolutos ya que en el medio existen trazas de dichas sales aportadas por las impurezas de los reactivos de análisis en cantidad imponderable.

Comentario.- Se observa que la concentración de 0,05 grs/litro y la de 0,1 grs/litro son las más favorables a la producción de ácido fumárico alcanzando un rendimiento del 52 por ciento sobre la glucosa consumida. Concentraciones superiores a las indicadas son perjudiciales, retrasan el desarrollo miceliar y el rendimiento desciende al 47 por ciento con la concentración de 0,4 grs/litro y a 37 por ciento con la de 0,8 grs/litro.

2ª. serie experimental.- Variaciones en la concentración de sal de cinc.

Con el medio inicial de Garrido (30) modificado como se detalla en la anterior serie experimental, se ensayan en cultivo superficial cinco concentraciones de sulfato de cinc, manteniendo constantes todos los componentes del medio base.

Las concentraciones ensayadas son:

0, 0,0035, 0,006, 0,025, 0,05, y 2,0 grs/litro.

Los resultados de este ensayo, cuyas condiciones experimentales de temperatura, pH y adición de carbonato cálcico estéril son idénticas a las de la primera serie experimental de este Capítulo, se recogen en la Tabla II.

TABLA I

Influencia de la concentración de sulfato férreo, en cultivo superficial, sobre la producción de ácido fumárico. pH inicial - 6. Temperatura de incubación: 30°C. Carbonato cálcico estéril 5 %, a los tres días de incubación.

(SO ₄) ₂ Fe ₂ Grs/litro	Azúcar invertido grs/100 cc		Acido fumárico grs/100 cc	Rendimiento en ac. fumárico grs/ 100 grs. azúcar cons.
	Inicial	Consumido		
0	10,2	10,15	5	49
0,025	"	10,19	5	49
0,05	"	10,2	5,3	52
0,1	"	10,1	5,3	52
0,4	"	10,2	4,8	47
0,8	"	10,2	5,8	57

TABLA II

Influencia de la concentración de sulfato de cina, en cultivo superficial, sobre la producción de ácido fundríco. pH inicial = 6. Temperatura de incubación : 30°C. Carbonato cálcico estéril 5 %, a los tres días de incubación.

SO ₄ 2n. 7 H ₂ O grs/litro	Azúcar invertido grs/100 cc		Acido fundríco grs/100 cc	Rendimiento en grs ac. fundríco/ 100 grs azúcar cons.
	Inicial	Consumido		
0	10,2	10,2	5	49
0,0035	"	"	5,2	50
0,006	"	"	5,2	50
0,025	"	"	4,6	45
0,05	"	"	5,0	49
2,0	"	"	0	0

Comentarios.— La producción de ácido fumárico es más elevada en presencia de la menor cantidad de sulfato de cinc, e incluso cuando no se añadió cinc las impurezas de los reactivos utilizados bastaron para conseguir rendimientos del 49 por ciento. Esta afirmación de la presencia de impurezas se ha comprobado con un medio de cultivo purificado según Steinberg (78) (calentando en autoclave el medio completo durante 15 minutos a la presión de una atmósfera, con un exceso de carbonato cálcico y filtrando en caliente). En esta ocasión el desarrollo del - moho fué precario.

Con la máxima concentración de 2 grs/litro no se observó desarrollo, comprobando el efecto inhibitorio de las altas concentraciones de sulfato de cinc.

3ª. serie experimental.

Las concentraciones de sulfato férrico y sulfato de cinc que resultan las más convenientes para la producción de ácido fumárico según se deduce de las dos series experimentales precedentes, se han utilizado en la preparación de un medio de - cultivo que contiene 0,05 grs/litro de sulfato férrico y 0,0035 grs/litro de sulfato de cinc manteniendo constante el resto de las sales que componen el medio de Garrido (30). Dicho medio de cultivo con las concentraciones reseñadas de hierro y cinc, se denomina para simplificar MEDIO D.

En la Tabla III se recogen los resultados de comparar el MEDIO D con el medio completo en el que las concentraciones de sulfato férrico y sulfato de cinc son respectivamente 0,20 y 0,013 gra/litro. Esta comparación se efectúa tanto en cultivo superficial como sumergido.

Comentario.— En cultivo superficial el MEDIO D produce mejores resultados que el medio completo sin modificación en la concentración de hierro y cinc, denominado para mayor sencillez MEDIO B.

En cultivo sumergido no existe notable diferencia. Los rendimientos son superiores en cultivo superficial al compararlos con el cultivo sumergido que se lleva a cabo en matraces erlenmeyer de 500 cc. de capacidad con 100 cc. de medio. En el agitador-bandeja se consigue en estos recipientes una aireación precaria como se demuestra en los ensayos 5º y 6º. del presente Capítulo, al utilizar nuevos recipientes (véase Fig. 1).

TABLA XII

Comparación de los medios B y D en cultivo superficial y sumergido. La adición de carbonato cálcico estéril se hace en ambos cultivos a los tres días de la inoculación. Temperatura de incubación: 30°C. Cultivo sumergido en agitador-bandeja con matraces de 500 cc, vidrio Pyrex.

Retención del medio cultivo	Azúcar invertido gms/100 cc		Ácido fúndrico gms/100 cc	Rendimiento en gms fúndrico/100 gms azúcar cons.
	Inicial	Consumido		
Cultivo superficial				
Medio B	12,5	12,5	4,0	30
Medio D	12,5	12,5	5,2	42
Cultivo sumergido				
Medio B	12,5	12,2	3,4	19
Medio D	12,5	12,0	2,2	10

4ª. serie experimental..- Variaciones simultáneas en las concentraciones de hierro y cinc.

Se ha observado que altas concentraciones de sulfato férrico y sulfato de cinc, resultan nocivas para la producción de ácido fumárico y el desarrollo del moho.

En esta serie se ha sustituido el sulfato férrico por sulfato férrico amónico con 12 moléculas de agua en cantidad equivalente al medio original (0,07 grs/litro).

Para conocer el límite máximo compatible con el desarrollo y en qué medida influyen las concentraciones de ambos cationes, se preparan 32 medios distintos con concentraciones del sulfato de cinc intermedias entre 0,05 grs./litro y 2,0 grs/litro ya que en la Tabla II se comprobó la inhibición provocada por esta última concentración de sal de cinc.

El catión férrico se añade en forma de $(\text{SO}_4)_2\text{FeNH}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en cuatro concentraciones distintas que son:

0,014, 0,028, 0,042 y 0,056 grs/litro.

En cada ensayo se mantiene fija una determinada concentración de sulfato de cinc frente a 4 concentraciones diferentes de sulfato férrico amónico en cultivo superficial.

Los resultados se detallan en la Tabla IV.

Concentraciones elevadas de sulfato de sime y sulfato férrico anódico compatibles con el desarrollo, y su influencia en la producción de ácido fumárico en cultivo superficial, 5% CO₂ en esteril a los tres días de incubación. Temperatura, 30°C, pH inicial - 6.

SO ₄ Zn.7H ₂ O	(SO ₄ FeNH ₄ 12H ₂ O) g/100 cm ³	Azúcar Inicial g/100 cm ³	consumido Consumido g/100 cm ³	Acido fumárico g/100 cm ³	Materia seca gramos por tér mino medio cada día 4 micelios	Rendimiento en ácido fumárico g/100 g. de az úcar consumido
0,06	0,014	9	8,9	4,4	0,13	49
"	0,028	9	9	4,5	0,12	50
"	0,042	9	9	4,3	0,15	47
"	0,056	9	9	4,0	0,18	44
0,08	0,014	9	8,9	4,4	0,13	49
"	0,028	9	8,9	4,3	0,17	48
"	0,042	9	9	4,2	0,17	47
"	0,056	9	9	4,0	0,19	44
0,1	0,014	9	8,9	4,5	0,21	50
"	0,028	9	8,9	4,4	0,20	49
"	0,042	9	9	4,1	0,20	45,5
"	0,056	9	8,9	4,5	0,17	50
0,2	0,014	9	9	4,4	0,18	49
"	0,028	9	9	4,1	0,16	45,5
"	0,042	9	8,9	4,6	0,23	51
"	0,056	9	8,9	3,9	0,22	43,3
0,4	0,014	9	8,9	4,8	0,18	53
"	0,028	9	9	3,25	0,19	36
"	0,042	9	8,9	4,4	0,20	48
"	0,056	9	8,8	4	0,22	44
0,8	0,014	9	8,2	3,25	0,12	39
"	0,028	9	8,6	4,25	0,23	47
"	0,042	9	8,9	4,15	0,22	46
"	0,056	9	8,8	3,7	0,14	42
1,2	0,014	9	7,2	2,5	0,12	40
"	0,028	9	6	2,4	0,10	40
"	0,042	9	7	2,8	0,10	40
"	0,056	9	6	2,2	0,05	37
1,5	0,014	9	4,6	0,6	0,02	13
"	0,028	9	5,5	---	0,09	---
"	0,042	9	8,4	2,9	0,17	34
"	0,056	9	6,1	1,9	0,09	37

Comentario.— Los mejores rendimientos se producen en cada serie cuando las concentraciones de sulfato férrico amónico son de 0,014 y 0,028 grs/litro. Descienden los rendimientos al aumentar las concentraciones de ambas sales y se observa un efecto favorable, en que se neutralizan los efectos tóxicos, cuando la concentración de sulfato de cinc es de 1,5 gra/litro y las de sulfato férrico amónico alcanzan los valores de 0,042 y 0,056 grs/litro.

5ª. serie experimental.— Variaciones en la concentración de hierro en cultivo sumergido con nuevos recipientes.

En cultivo sumergido y para comprobar el efecto de la aireación frente a altas concentraciones de sulfato férrico, se preparan seis medios de cultivo con las siguientes concentraciones de $(SO_4)_3Fe_26H_2O$:

0, 0,025, 0,050, 0,1, 0,5, y 1,0 grs/litro frente a 0,006 grs/litro de sulfato de cinc.

La concentración de sulfato amónico debe ser de 1,5 gra/litro para cultivo sumergido como se demostrará en el siguiente Capítulo de esta Tesis. También conviene para dicho tipo de cultivo que la concentración de sacarosa invertida sea del 6 por ciento. El pH en el medio inicial es igual a 6 y la temperatura de incubación 34°C. al tiempo de inocular se añaden 4 grs. por ciento de polvo de marmol estéril (carbonato cálcico cristalizado).

En este ensayo se estudian en distintos tiempos de incubación el efecto de las concentraciones de sulfato férrico detalladas al principio.

En la Tabla V se observa los datos obtenidos en esta serie experimental empleando nuevos recipientes que aumentan notablemente la agitación y aireación del medio de cultivo (véase Fig. 1).

Comentario.— Los rendimientos se elevan al 60 por ciento sobre el azúcar consumido cuando la aireación es apropiada siendo el tiempo óptimo de cultivo el de 4 días.

En la serie cuyo medio de cultivo no se adicionó con sulfato férrico se advierten los mejores rendimientos en dicho tiempo de cultivo, alcanzándose el 65 por ciento sobre azúcar consumido. En cultivo sumergido los rendimientos mejoran si la concentración inicial de azúcar es de 6 grs. por ciento acortándose además el tiempo de cultivo.

Las concentraciones de 0,5 y 1,0 grs/litro son desfavorables para el desarrollo y consiguientemente para la producción de ácido fumárico como puede observarse en la falta de consumo de azúcar en los datos correspondientes a los dos días de incubación, cuando el resto de la serie con menor concentración de sulfato férrico ha consumido totalmente el azúcar disponible.

Los rendimientos disminuyen al prolongar el tiempo de

cultivo, lo que parece indicar un metabolismo más completo al agotarse la fuente de carbono que proporciona la glucosa.

Sexta serie experimental.— Variaciones en la concentración de cinc en cultivo sumergido en nuevo recipiente.

En la serie experimental anterior pudo comprobarse que el medio más favorable a la rápida producción de ácido fumárico era precisamente aquél en que solamente existía sulfato de cinc en la concentración de 0,006 grs/litro y que carecía por tanto de hierro adicionado por nosotros. Esta serie experimental se prepara por tanto sin adición de sulfato férrico y probando en cultivo sumergido las siguientes concentraciones de sulfato de cinc:

0, 0,013, 0,025, 0,05 y 0,25 grs/litro.

Las condiciones de agitación y aireación son idénticas a las de la 5ª. serie experimental de este Capítulo. Los datos obtenidos en estas condiciones se recogen en la Tabla VI.

Comentario.— En el medio de cultivo sin más aporte de hierro que el proporcionado por las impurezas de los activos de análisis, puede observarse la influencia de altas concentraciones de cinc. Estas retrasan la producción de ácido fumárico y no permiten alcanzar los rendimientos consignados en la Tabla V cuando frente a distintas concentraciones de sulfato férrico se mantiene constante la concentración de sulfato de cinc de

TABLA V

Influencia de la concentración de sulfato férrico en cultivo sumergido sobre la producción de ácido fundríco, utilizando nuevos recipientes. pH inicial-6. Temperatura de incubación 34°C. Polvo de mármol estéril(CO_2 en cristallizado) 4% al tiempo de inocular.

(50 ₄) ₂ Po ₂ grs/litro	Azúcar invertido grs/100 cc		Acido fundrico grs/100 cc	Rendimiento en grs ac. fundricos/100 grs azúcar consumido	
	Inicial	Consumido			
Resultados a los dos días de incubación					
0,00	6,0	6,0	3,2		53
0,025	"	"	3,1		51
0,050	"	"	3,2		53
0,10	"	"	2,8		46
0,50	"	2,2	0		0
1,00	"	1,0	0		0
Resultados a los cuatro días de incubación					
0,00	"	6,0	3,9		63
0,025	"	"	3,6		60
0,050	"	"	3,3		53
0,10	"	"	3,6		60
Resultados a los seis días de incubación					
0,00	"	"	2,8		46
0,025	"	"	3,3		53
0,050	"	"	3,3		53
0,10	"	"	3,2		53

0,006 grs/litro.

A los dos días de incubación los rendimientos son mediores y se consume poca azúcar, sobre todo si comparamos con los resultados de la Tabla V en el mismo período de tiempo. También aquí aparece como período de incubación más favorable el de cuatro días. Concentraciones superiores a 0,05 grs/litro no son convenientes en cultivo sumergido.

Los datos aportados sobre cultivo superficial (véase Tabla II del presente Capítulo) concuerdan notablemente con los aquí anotados de cultivo sumergido.

TABLA VI

Influencia de la concentración de sulfato de cinc en cultivo sumergido, sobre la producción de ácido fumárico, utilizando nuevos recipientes. pH inicial-6. Temperatura de incubación 34°C. Adición de 4 % de polvo de mármol estéril (CO₂ Ca cristalizado) al tiempo de inocular.

SO ₄ 22.7 H ₂ O grs/litro	Azúcar invertido grs/100 cc Inicial	Consumido	Acido fumárico grs/100 cc	Rendimiento en grs ac. fumárico/100 grs azúcar consum.
Resultados a los dos días de incubación				
0.00	6.5	4.4	1.2	27
0.013	"	4.2	1.1	26
0.025	"	4.7	1.2	25
0.05	"	4.2	0.9	21
0.25	"	2.3	0	0
Resultados a los cuatro días de incubación				
0.00	"	6.4	3.0	47
0.013	"	6.2	2.9	46
0.025	"	6.1	2.8	45
0.05	"	6.4	3.2	50
0.25	"	6.0	2.1	35
Resultados a los seis días de incubación				
0.00	"	6.4	3.2	50
0.013	"	"	2.9	45
0.025	"	"	2.7	42
0.05	"	"	3.0	47
0.25	"	"	2.4	37

CAPITULO II

Parte teórica.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE FOSFATO

El papel del P. como nutriente esencial para organismos vivos, ha sido reconocido hace muchos años. Su relación con los mecanismos de transporte de energía se descubrió cuando los hermanos Buchner intentaron obtener con fines terapéuticos, proteínas a partir de levaduras.

Harden y Young en 1905 (32) observaron que la fermentación del azúcar por extractos de levaduras se aceleraba grandemente añadiendo ácido fosfórico y pudieron comprobar que el fosfato inorgánico se esterificaba con los azúcales.

Algunos de estos esteres tienen por misión fundamental el acumular la energía resultante de la oxidación del carbohidrato. Esta parece ser la función principal de los ésteres fosfóricos tales fosfoenolpirúvico, ATP, acetilfosfato, etc.

La fosforilación afecta a la difusión de las sustancias a través de las membranas y paredes celulares, un aspecto - digno de tenerse en cuenta en los procesos metabólicos. También se aumenta la solubilidad en agua para los compuestos que contienen P.

Dado que los ésteres fosfóricos son todos ácidos más fuertes que el ortofosfato de que proceden, la ionización de estos compuestos puede tener significación en su atracción electrostática para grupos cargados positivamente. Así, la presen-

cia de fosfato es probable que influyan en la unión de los ésteres fosfóricos a las proteínas enzimáticas.

Las consideraciones energéticas sobre el papel del P en el metabolismo son inacabables. El magnífico estudio de Lipmann (48) abarca muchas de las interpretaciones que se aceptan ya como clásicas.

Por nuestra parte hemos de referirnos más concretamente a las observaciones de la influencia que los fosfatos inorgánicos ejercen sobre el desarrollo y el metabolismo de levaduras, bacterias y sobre todo mohos.

Los mohos convierten el fosfato inorgánico en compuestos orgánicos y así pueden utilizar la glucosa y formar el micelio. Estas consideraciones se desprenden de los trabajos de Vorbrodt en 1919, uno de los primeros que estudió este aspecto, y más recientemente en los de Semeniuk (68) y Mann (52).

Conviene hacer notar que existen hipótesis contrarias al papel esencial que se atribuye al P en la glucólisis. Nord y Mull (57) sostienen que en la fermentación de azúcares por *Fusaria* no se demuestra la fase previa de fosforilación y discuten que ésta sea precisa en todos los procesos de degradación de azúcares por microorganismos.

La Tesis Doctoral de Gayet (31) comprende un detallado estudio de las distintas formas de acumulación de fósforo en *A.niger*, Van Tieghem, estudiando las variaciones que en dichas

fracciones lipídicas en forma de ésteres, fósforo proteico e nucleico, se producen durante el crecimiento del moho. Una conclusión importante es la relación entre la concentración inicial de fosfato y la velocidad de consumo de azúcar. En medios desequilibrados respecto al fósforo comprueba un escaso crecimiento miceliar y un consumo lento de glúcidos en los medios hipofosforados, mientras que la velocidad aumenta y existe paralelamente un buen desarrollo y máximo utilización del nitrógeno cuando el fósforo se encuentra en mayores concentraciones.

En la producción de grasas por mohos se ha evidenciado también la importancia de una adecuada concentración de fósforo en el medio y según los estudios de Garrido, Woodbine y Walker (29) *A. nidulans* precisa 355 mg/100 cc de medio de fósforo para dar rendimiento en grasa en su micelio del 49,8 por ciento, mientras que *P. javanicum* y *P. spinulosum* requieren 15,4 mg y 7,74 mgrs/100 cc de medio para conseguir, respectivamente 23,8 por ciento y 24,8 por ciento de grasa en micelio seco.

La síntesis de grasas por *P. lanosum* Westling que estudian Porras y Garrido (62) se verifica en las mejores condiciones cuando la concentración de KH_2PO_4 es de 0,068 grs/litro.

Un trabajo de Lockwood, Ward y May (50) muestra la influencía del $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ en la producción de ácidos d-láctico y fumárico por *Rhizopus cryzae*. Las concentraciones de 0,60 y 1,2 grs/litro favorecen la producción de d-láctico que alcanza un rendi-

miento del 59 por ciento sobre la glucosa consumida. Por el contrario, la mínima concentración utilizada 0,15 grs/litro consigue el mejor rendimiento en ácido fumárico con esta cepa.

Estos mismos autores con *P. javanicum* van Beijma (49) que produce ácido cítrico y grasas a partir de glucosa o xilosa adopta como óptima la concentración de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ de 0,3 grs/litro. Mayores concentraciones daban peores resultandos en cuanto a peso de micelio seco.

Ping Shu y Marvin Johnson (70) con una cepa de *A. niger* estudian la mutua relación existente entre los constituyentes del medio para la producción de ácido cítrico en cultivo sumergido. Frente a los resultados de Karow y Waksman (37) que estiman como óptimas las bajas concentraciones de fosfato, utilizan micelios preformados que reemplazan con glucosa purificada por coprecipitación con hidróxido de aluminio y a cuyo medio sólo se añaden cantidades exactamente medidas de los cationes Fe y Zn; entonces puede comprobarse que las concentraciones altas de fosfato son las mejores y deducen de estos resultados, además de la interdependencia de las concentraciones de fosfato, hierro y cinc que las bajas concentraciones de fosfato usadas por otros autores, sólo son convenientes cuando las cationes Fe y Zn están en exceso.

Precisamente el estudio de dicha interdependencia de los fosfatos con sales de Fe y Zn, junto con el tipo de cultivo

que se utiliza, forman con el estudio de las óptimas concentraciones de fosfato para producción de fumárico, el contenido de las series experimentales del Capítulo II de esta Tesis.

PARTE EXPERIMENTAL.

1ª. serie experimental..- Variaciones en la concentración de fosfato monosódico.

Con el siguiente medio básico:

$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,06	grs/litro.
SO_4K_2	0,06	id.
$(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$	0,20	id.
$\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,013	id.
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	2,0	id.
sacarosa invertida	110,0	id.

Se ensayan distintas concentraciones de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

El pH inicial es igual a 6. A los tres días de inoculación se añade 5 grs. por ciento de carbonato cálcico estéril. La temperatura se mantiene a 34° y el cultivo es superficial.

Las concentraciones de fosfato monosódico que se estudian son: 0,05, 0,09, 0,18, 0,36 y 3,6 grs/litro.

En la Tabla VII se agrupan los resultados en las condiciones experimentales descritas a los quince y veinte días de incubación.

Comentario..- La concentración más adecuada de fosfato monosódico parece ser por los datos experimentales, la de 0,18 grs/litro. El rendimiento que se consigue con dicha concentración (52 por ciento sobre el azúcar consumido) destaca entre dos rendimientos mucho menores correspondientes a las concentra-

ciones respectivamente mayor y menor de 0,18 grs/litro. Esto puede interpretarse suponiendo un equilibrio entre las concentraciones de fosfato y el resto de los componentes del medio de cultivo, que fijan por lo tanto la concentración óptima de fosfato monosódico la cual no debe ser alterada para obtener buenos rendimientos.

El tiempo de cultivo es un factor importante, ya hemos observado que al agotarse la fuente de carbono procedente de la glucosa el microorganismo continua obteniendo energía del ácido fumárico que previamente había acumulado. Es necesario saber con exactitud el período en que termina el consumo total de la glucosa para conseguir el máximo rendimiento en fumárico y no sufrir pérdidas.

En la Tabla VII puede verse cómo depende el consumo de azúcar de la concentración de fosfato monosódico ya que dicho consumo es mucho menor con pequeñas concentraciones de fosfato.

2ª. serie experimental..- Variaciones en la concentración de fosfato monosódico y sulfato de cinc.

Las concentraciones de fosfato monosódico ensayadas anteriormente se repiten de nuevo pero reduciendo la concentración de sulfato de cinc al valor de 0,0035 grs/litro. Las condiciones de cultivo son idénticas a la serie anterior porque tratamos de probar la influencia de cinc en cultivo superficial -

TABLA VII

Influencia de la concentración de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ frente a concentraciones de 50 mg. l^{-1} de H_2O de 0.01 g/l y 0.02 g/l de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$. Temperatura 30°C . Cultivo superficial. 5% de CO_2 estéril añadido a los tres días de la inoculación.

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ g/l	Asúcar invertido g/l	Acido fúlvico g/l	Materia seca g/l	Rendimiento en gms fúlvico/100 gms azúcar cons.
QUINCE DIAS				
0.03	11	7.0	0.48	32
0.09	"	8.7	0.60	30
0.18		9.6	0.88	52
0.36		10.3	0.60	25
3.6		9.7	0.72	44
VEINTE DIAS				
0.03	11	7.4	1.0	23
0.09	"	9.0	0.8	26
0.18	"	10.0	1.0	46
0.36	"	11.0	0.8	32
3.6	"	10.8	1.0	42

TABLA VIII

Influencia de la concentración de PO_4HNa . $2\text{H}_2\text{O}$ frente a concentraciones de $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de 0,0035 grs/litro y $(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$ de 0,20 grs/litro. Temperatura 30°C. Cultivo superficial. 5 % de carbonato cálcico estéril añadido a los tres días de incubación.

$\text{PO}_4\text{HNa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ grs/litro	Asúcar invertido grs/100	Acido fumérico grs/100	Materia seca grs/100	Rendimiento grs fumarico/ 100 grs azúcar con humid.
	Inicial	Consumido		
QUINCE DIAS				
0,05	10,8	5,3	0,2	32
0,09	-	5,4	0,2	31
0,18	-	9,3	0,6	40
0,36		10,5	0,5	43
3,6		10,0	0,5	50
VEINTE DIAS				
0,05	10,8	4,0	0,5	60
0,09	-	6,8	0,5	40
0,18		10,8	1,0	48
0,36		10,8	0,7	24
3,6		10,8	0,6	40

respecto a la concentración de fosfato monosódico.

Los datos de la Tabla VIII se refieren a dos tiempos de incubación: quince y veinte días.

La temperatura es de 34°, el pH inicial igual a 6 y la adición de carbonato cálcico se hace como en la serie anterior.

Comentario.— La concentración menor de sulfato de cinc influyen en el consumo de azúcar que se reduce en las muestras de quince días comparadas con las correspondientes de la Tabla VII. Ya que en esta Tesis los rendimientos de ácido fumárico se calculan sobre azúcar consumido resultan mejores rendimientos a los veinte días de incubación. Precisamente con una concentración de fosfato monosódico de 0,05 grs/litro llega a alcanzarse al 60 por ciento de rendimiento.

El tiempo de cultivo se prolonga en esta serie respecto del anterior para alcanzar rendimientos iguales. Con 0,10 grs/litro de fosfato monosódico se logra un rendimiento del 48 por ciento a los veinte días de cultivo que destaca también entre dos valores más bajos y confirma la existencia de un equilibrio entre el fosfato y las restantes sales del medio.

3ª. serie experimental.— Variaciones en la concentración de fosfato monosódico respecto a las de $(\text{SO}_4)_2\text{FeNH}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, en cultivo superficial.

El medio de cultivo está constituido por las sales mine-

rales cuya concentración se indica en la primera serie experimental, de este Capítulo. Unicamente se varían de la forma que a continuación se indica las concentraciones de fosfato monosódico y sulfato de hierro y cinc:

Medio A: sin adición de sulfato de cinc.

con 0,12 grs/litro de $(\text{SO}_4)_2\text{FeNH}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

Medio B: sin adición de $(\text{SO}_4)_2\text{FeNH}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

con 0,0035 grs/litro de sulfato de cinc.

Medio C: con 0,12 grs/litro de $(\text{SO}_4)_2\text{FeNH}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

con 0,013 grs/litro de sulfato de cinc.

Medio D: con 0,12 grs/litro de $(\text{SO}_4)_2\text{FeNH}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

con 0,0035 grs/litro de sulfato de cinc.

Medio E: con 0,48 grs/litro de $(\text{SO}_4)_2\text{FeNH}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

con 0,0035 grs/litro de sulfato de cinc.

Las variaciones en la concentración de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ se indican a continuación:

Medio 1: 0,09 grs/litro de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Medio 2: 0,18 idem. idem.

Medio 3: 0,36 idem. idem.

Medio 4: 0,72 idem. idem.

Medio 5: 7,2 idem. idem.

Por tanto en la nomenclatura de este ensayo se combinan ambas notaciones entendiendo que el medio 5_B corresponde a la

concentración de fosfato monosódico del medio 5 (7,2 grs/litro) a las concentraciones de 0,0035 grs/litro y cero de sulfato de cinc y sulfato férrico amónico respectivamente.

En la presente serie se estudia el efecto de ambos cationes en relación a la concentración de fosfato en cultivo superficial, neutralizando el medio de cultivo a los tres días de la inoculación con 5 grs por ciento de polvo de mármol es téril. El pH inicial es igual a seis y la temperatura de incubación se mantiene a 34° durante diez días que dura el cultivo.

Los resultados de este ensayo aparecen en las figuras números 2 y 3, siendo la nº. 2 la que corresponde al efecto que una determinada concentración de fosfato experimental frente a diversas concentraciones de hierro y cinc. La Fig. nº. 3 muestra el efecto de distintas concentraciones de fosfato monosódico ante concentraciones idénticas de hierro y cinc con ausencia de alguno de dichos cationes.

Comentario.— Siguiendo el trazado de las curvas que relacionan una determinada concentración de fosfato monosódico con las concentraciones de sulfato férrico amónico y sulfato de cinc, que se ensayan, se observa en la Fig. 2 las siguientes particularidades:

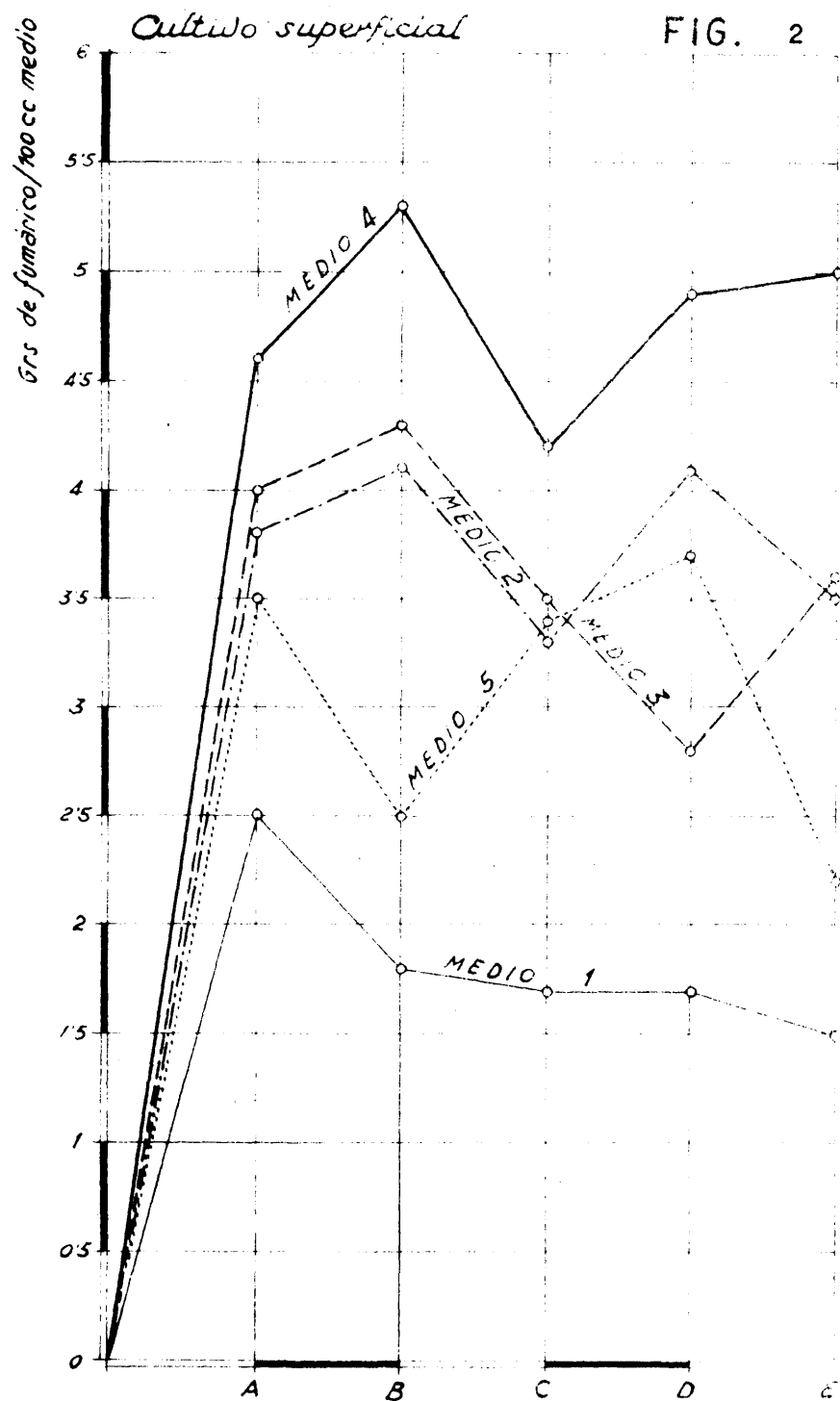
El medio 1 con 0,09 grs/litro de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, produce los menores rendimientos en ácido fumárico y sigue la tenden-

cia de la curva representativa del medio 5 (7,2 grs/litro de fosfato monosódico).

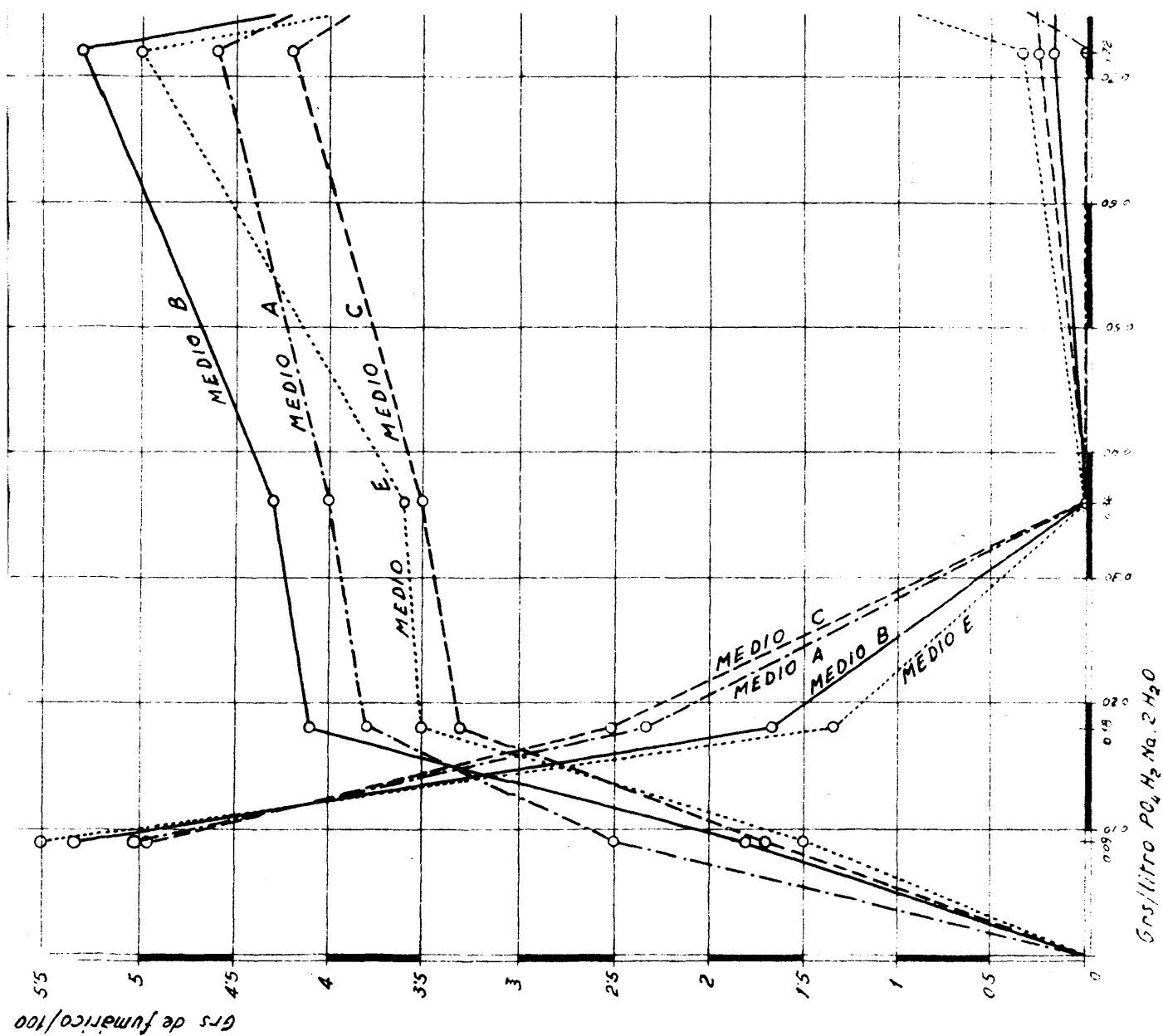
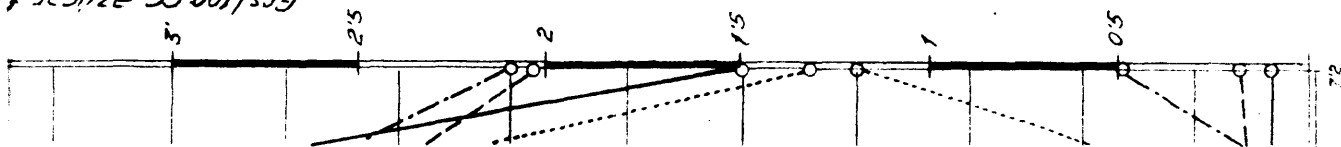
Los restantes medios 2,3 y 4 cuyas concentraciones en fosfato monosódico son intermedias entre los anteriormente citados, presentan un máximo en la producción de fumárico cuando el medio contiene 0,0035 grs/litro de sulfato de cinc y no ha habido adición de hierro por nuestra parte.

En la Fig. 2 que representa la influencia que sobre una concentración dada de sulfato férrico amónico y sulfato de cinc las concentraciones de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ensayadas se advierte que el consumo de azúcar en total en todos los medios que contienen 0,36 grs/litro de fosfato monosódico y que el equilibrio P/C necesario para la óptima producción de fumárico y el aprovechamiento del azúcar disponible en el medio, se altera cuando las concentraciones de fosfato son superiores.

El medio B (sin adición por nuestra parte de sulfato férrico amónico y con 0,0035 grs/litro de sulfato de cinc), alcanza los valores más altos en la producción de fumárico. Le sigue en eficacia el medio A) (que sólo contiene el cinc aportado por las impurezas y 0,12 grs/litro de sulfato férrico amónico) demostrando que en cultivo superficial son convenientes bajas concentraciones de dichos elementos y que bastan las impurezas de los reactivos de análisis para lograr aceptables rendimientos. En altas concentraciones de las sa-



Grns/100 cc azúcar



les aparecen sin duda problemas de ósmosis y difusión cuyo estudio sale de los propósitos de esta Tesis así como la explicación de todos los factores influyentes que no sean los modificados en estos ensayos.

4ª. serie experimental..- Variaciones en la concentración de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en relación a las de $(\text{SO}_4)_2\text{FeNH}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en cultivo sumergido en nuevos recipientes.

Esta serie experimental se distingue de la que la precede únicamente en que se efectúa en condiciones de cultivo sumergido empleando los nuevos recipientes diseñados por nosotros y cuyo esquema aparece en la figura 1 de los métodos de trabajo y análisis.

La anotación de los medios de cultivo es por tanto idéntica ya que se han repetido las concentraciones indicadas en cada medio de cultivo.

Las condiciones de cultivo en cuanto a pH y temperatura son también las mismas y varía naturalmente la agitación, que no existe en cultivo superficial, y mayor posibilidad de aireación debida precisamente a la agitación y a la forma especial de los recipientes que facilitan el choque con ambas paredes, la formación de espuma, etc.

Los resultados de este ensayo se reflejan en las figuras 4 y 5 que corresponden a la influencia del fosfato frente a distintas concentraciones de sulfatos de hierro y cinc y la

nº. 5 al efecto de una determinada concentración de hierro y cinc frente a distintas concentraciones de fosfato monosódico que se ensayan.

Comentario.— En las figuras 4 y 5 se advierten los siguientes detalles:

Las condiciones de cultivo sumergido, mayor contacto entre el micelio y el sustrato y mayor aireación, hacen bien distinto este cultivo del llamado estacionario o superficial. En este caso que se efectúa con medios de cultivo idénticos al ensayo anterior, la observación de las curvas correspondientes a una determinada concentración de fosfato monosódico frente a distintas concentraciones de sulfato férrico amónico y sulfato de cinc, nos muestra un valor máximo para la producción de fumárico en todos los medios, cualquiera que sea su concentración en hierro y cinc, correspondiente a la concentración de fosfato monosódico de 0,72 grs/litro.

La tendencia de la línea correspondiente al medio 1, es también notablemente parecida a la obtenida en cultivo superficial.

El medio 4 con 0,72 grs/litro de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ resulta más favorable y confirma otra vez la existencia de un equilibrio entre la concentración de fosfato y el resto de las sales que se altera sensiblemente al aumentar en el medio 5.

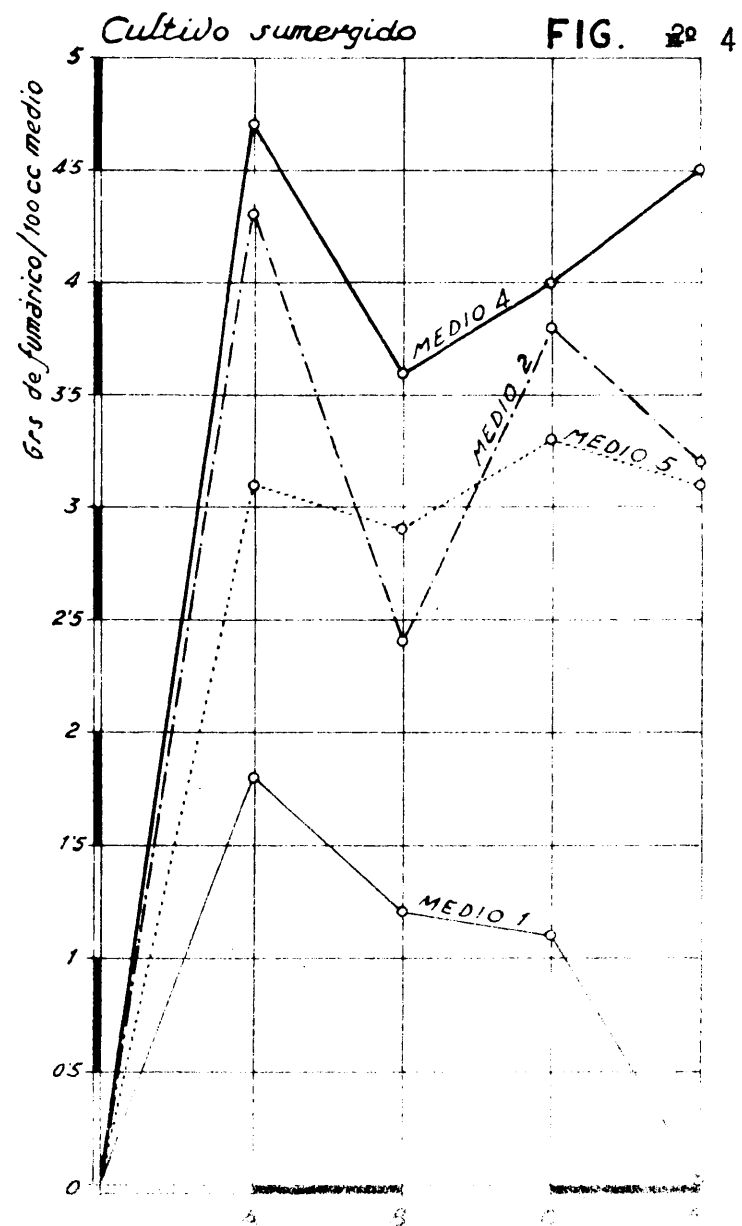
La presencia de hierro en el medio resulta favorable en

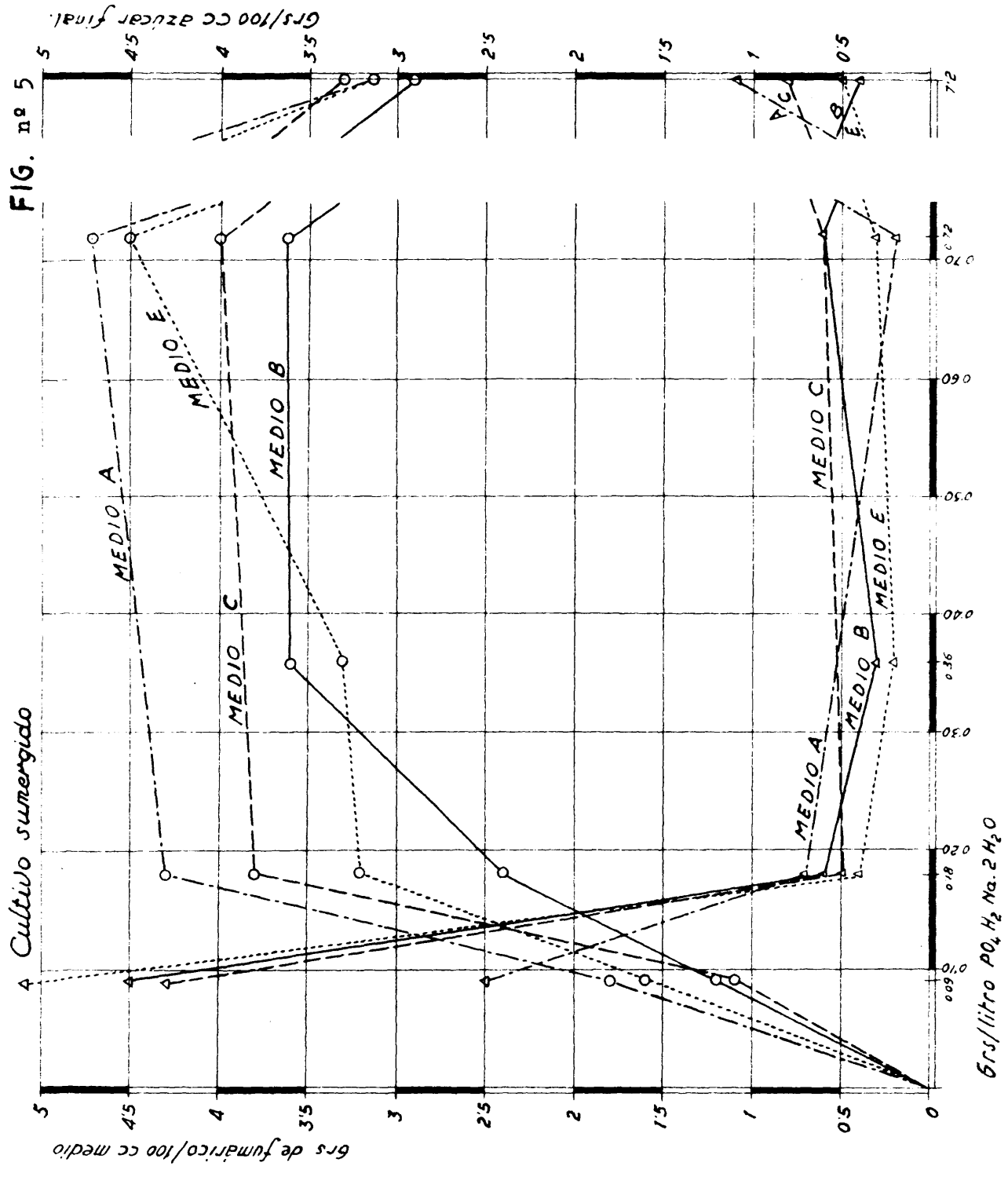
cultivo sumergido, empleando los recipientes diseñados por nosotros, de tal manera que en el medio B, las impurezas que aportasen hierro en cantidad indeterminada no bastan para con seguir tan buenos rendimientos como en el medio A. La beneficiosa influencia del hierro se manifiesta de nuevo en el medio C.

En la figura nº 5 resulta que con todas las concentraciones ensayadas de fosfato monosódico, el medio A consigue los mejores resultados y el medio B por el contrario los valores más exigüos. El medio C ocupa una posición intermedia superior al medio B que carece de la aportación de hierro por nuestra parte.

El consumo de azúcar refleja asimismo estas influencias de los cationes hierro y cinc. Es más completo el consumo en presencia de hierro únicamente, el cinc impide de alguna manera este consumo ya que en el medio C, con la misma concentración de sulfato férrico amónico que el medio A, tiene cinc en la concentración de 0,013 grs/litro y el consumo de azúcar es también menor.

Las anteriores observaciones se refieren a concentraciones de fosfato monosódico de 0,09 gra/litro, porque con mayores concentraciones el consumo de azúcar es prácticamente completo y no pueden hacerse. Por esto no se advierten estos extremos en los trabajos de Bernhauer y Thole (5) ni en





los de Foster y Waksman (23) que emplean siempre concentraciones superiores (0,025 por ciento de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y 0,05 por ciento de PO_4HK_2 respectivamente) y que por tanto, refieren sus resultados únicamente a la conversión de glucosa a fórmico favorecida o no por el Zn, sin aclarar si el consumo de azúcar inicial es total o incompleto por la Acción del Zn.

Para advertir esta influencia es preciso trabajar en medios de cultivo con concentraciones de fosfato inferiores a 0,18 grs/litro, en cultivo sumergido.

CAPITULO III

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA QUE, SOBRE LA PRODUCCION DE ACIDO FUMARICO Y EL DESARROLLO DEL MOHO, TIENEN LOS AGENTES NEUTRALIZANTES.

Parte teórica.

Los mohos que pertenecen al género Mucorales no desarrollan favorablemente en medios de pH ácido y se ha comprobado por distintos autores que, la producción de ácido consiguiente a un buen desarrollo del moho, es impedida cuando los medios de cultivo tienen una alta concentración de hidrogeniones.

El uso de agentes neutralizantes es imprescindible en la producción de ácido fumárico por mohos del género Rhizopus.

Los bajos resultados obtenidos por Erlich (20) pueden atribuirse, entre otras cosas, a que no adicionó al medio de cultivo ninguna cantidad de carbonato cálcico que es el agente neutralizante más comunmente usado.

Sin embargo, hay que precisar en estos aspectos de la adición o no adición de agentes neutralizantes, en la cantidad y en el tipo de agente neutralizado, ya que todos estos detalles dan lugar a comportamientos muy distintos en cuanto a desarrollo y producción. (84).

Un medio de cultivo inicialmente alcalino, ejerce un desfavorable efecto sobre la germinación de las esporas de Rhizopus y por esto la inoculación no conviene, según Waks-

man (90) hacerla en medio de pH alcalino. Frente a esta observación nuestros ensayos en cultivo sumergido son algo contradictorios.

Cuando las esporas han germinado, y se ha desarrollado un buen micelio, comienza la producción de ácido fumárico y tiende a bajar el pH del medio, de manera que entonces conviene para mantener la producción adicionar un agente neutralizante que vaya combinándose con el ácido formado y sus trayéndole al medio. Los datos de algunos autores (10) son muy ilustrativos en este aspecto, por ejemplo:

Cultivos con sustrato hidrocarbonado neutralizados con carbonato cálcico dan un rendimiento en ácido fumárico sobre la glucosa consumida del 30 al 40 por ciento mientras que en las mismas condiciones pero sin adicionar carbonato cálcico, el rendimiento sólo llega a 0,5 por ciento. Butkewitch y Fedoroff afirman en dicho trabajo citado que la mayor acidez del medio retrasa la producción y el consumo de azúcar y que la velocidad del consumo se acelera en presencia de carbonato cálcico.

Pero existe también la adición de neutralizante en cultivos con micelio preformado, es decir, con un micelio formado en un medio de cultivo determinado que cuando alcanza su máximo desarrollo, se lava con agua estéril para desalojar todas las sales y productos de su anterior metabolismo y se -

reemplaza (estos tipos de cultivo se llaman por esto cultivos de reemplazamiento) con otra solución nutritiva que, a efectos del estudio que nos ocupa, suele ser únicamente de con o sin agente neutralizante. El micelio formado ya, se conduce de otra manera ante neutralizante y así tenemos que una cepa de *Rh. nigricans* nº 45 aislada por Foster y Wakamann (22) actuando sobre una solución de glucosa al 10 % sin carbonato cálcico, produce un rendimiento en ácido fumárico del 22 %. El pH del líquido de cultivo era en esta ocasión del 2,4 e incluso llegó a cristalizar en el medio el ácido libre.

También en cultivos de reemplazamiento, Butkewitsch y Fedoroff (10), observaron la misma conducta ante el carbonato cálcico que hemos reseñado para cultivos iniciales y advierten una gran diferencia de rendimientos: 20 % en presencia de carbonato cálcico y solamente el 2 % cuando está ausente y no se usa otro tipo de neutralizante.

Encontramos en la literatura consultada el empleo de distintos neutralizantes, sólidos y en líquidos.

Frente a la mayor insolubilidad del carbonato cálcico, que permite añadirlo al medio de una vez y que lentamente se disuelva en contacto con el ácido producido, se observa por Waksman (90) que la relativa insolubilidad del fumarato cálcico formado y que provoca su rápida cristalización dentro del medio de cultivo hace cesar completamente la conversión

de azúcar en ácido y que sería conveniente sustituir dicho carbonato por carbonato sódico o sosa que vaya añadiéndose al cultivo conforme se va produciendo el ácido manteniendo el pH entre los óptimos valores de 5,0 y 6,5.

En este sentido el trabajo de Rauch, Miksch, Mielke-Misch y Konrad Bernhauer (6) es muy sugestivo. Emplean el carbonato sódico 4N como agente neutralizante frente a un indicador que puede ser rojo de metilo (que vira entre rojo y amarillo a pH 5,2) o púrpura de bromocrésol (de amarillo a púrpura a pH 6,3) añadidos en el medio de cultivo en la concentración de 0,01 % sin temor a interferencias. De este modo se evitan las dificultades de la cristalización de fumarato cálcico y por las sucesivas adiciones de carbonato sódico 4N puede irse valorando la concentración en ácido del medio. En su experiencia para un cultivo que dura de 15 a 18 días necesitan 15 a 20 cc. de carbonato sódico 4N que corresponden a 600-920 cc. de ácido, en este tipo de cultivo sumergido con una cepa de Rh. Delemar, es del 40-60 % de glucosa inicial se produce el 10-15 % de ácido láctico y el 10-15 de etanol.

También pueden usarse en este sentido las soluciones de hidróxido sódico o potásico.

Y finalmente un aspecto importante y que hemos tenido ocasión de comprobar en nuestro propio trabajo es el que se

refiere a la cantidad de CO_3Ca añadido, a su grado de pureza y a su insolubilidad. Cuando se emplea marmol influye también su grado de pulverización.

Las diferencias observadas en todos los ensayos entre los cultivos sumergidos y superficiales vuelven a comprobarse aquí y se detallan en las experiencias que siguen, del Capítulo III de esta Tesis, en que se han utilizado como neutralizantes el CO_3Ca amorfo, reactivo de análisis y otro de menor pureza, adicionado al tiempo de inocular o cuando el micelio ya ha comenzado a formarse, así como polvo de marmol (CO_3Ca cristalizado) y CO_3Na_2 4N. La fuente de nitrógeno es un factor interesante en este sentido como hemos observado utilizando urea en los medios de cultivo.

PARTE EXPERIMENTAL.

1ª. serie experimental.- Adición de distintas cantidades de CO_3Ca amorfo como neutralizante, en cultivo superficial.

El medio original utilizado por Garrido (30-) se ha modificado sustituyendo el cloruro férrico (que interfiere el método de análisis de fumárico empleado) por sulfato férrico amónico $(\text{SO}_4)_2\text{FeNH}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ en cantidad equivalente a (0,07 grs litro) siendo la concentración de $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ de 0,0035 grs/litro.

Las restantes sales del medio citado se conservan en la concentración original.

En este ensayo observaremos cómo modifica el rendimiento en ácido fumárico la cantidad de carbonato cálcico amorfo añadida al medio de cultivo para mantener el pH en los límites precisos para el desarrollo del moho.

En cultivo superficial, matraces de 100 cc. de capacidad, vidrio Belgor, con 25 cc. de medio cada uno. La duración del cultivo es de catorce días y el CO_3Ca se adiciona a los cuatro días de la inoculación cuando el medio comienza a ser ácido y existe una ligera capa miceliar en la superficie.

Las cantidades de CO_3Ca añadidas son: 3, 5, 7, 8 y 12 grs/100 cc. de medio de cultivo. La temperatura se mantiene en 32°C . y el pH inicial es igual a 6.

Los resultados de este ensayo aparecen en la Tabla ^{IX}~~XXIII~~.
Comentario.- El consumo de azúcar y el micelio producido, que

muestra el desarrollo del moho, no son afectados de manera notable por cantidades de CO_3Ca hasta del 12 por ciento. En la Tabla IX se observa que el consumo de azúcar es total excepto en el último dato y que los pesos de materia seca son sensiblemente iguales.

En cuanto a la producción de ácido fumárico se alcanza el rendimiento del 45 por ciento, si la concentración de carbonato cálcico es del 3 por ciento. Este rendimiento va descendiendo paralelamente al aumento de neutralizante en el medio y se reduce al 25 por ciento cuando la cantidad de carbonato cálcico añadida es de 12 gramos por cada 100 cc de medio de cultivo.

2ª. serie experimental..- Influencia de la cantidad de CO_3Ca añadido como neutralizante en cultivo sumergido, en matraces.

Teniendo en cuenta las cantidades añadidas en cultivo superficial, en este ensayo efectuado en matraces Pyrex de 500 cc de capacidad mantenidos en agitador-bandeja a la temperatura de 32°C , se ensayan las concentraciones de 2, 4, 6, y 8 grs de CO_3Ca por cada 100 cc de medio cultivo.

Comentario..- Se comprobó que cantidades de carbonato cálcico superiores de los 2 grs/100 cc. inhibían totalmente la producción de fumárico, el desarrollo aunque precario se lograba. Únicamente con la concentración de 2 grs/100 cc. se obtenía ácido fumárico. (2,4 grs/100 cc. de medio).

En los matraces adicionados con 4, 6 y 8 grs de carbonato cálcico por 100 cc. de medio, no hubo ninguna producción de fumárico.

En matraces que contenían el mismo medio de cultivo re-señado repetidamente que los anteriores, y que se mantuvieron en igualdad de condiciones pero sin adición de neutralizante, aunque se produjo un ligero desarrollo micelial no hubo ni aún trazas de ácido fumárico. Esto demuestra la afirmación de que en ausencia de neutrizantes que mantengan en los límites adecuados el pH, el medio de cultivo, a lo largo del desarrollo del moho, no se produce ácido fumárico ni tampoco un normal desarrollo del microorganismo.

Esta observación es válida así mismo para cultivo superficial.

3ª. serie experimental.- Influencia de cantidades superiores a los 2 grs por ciento de carbonato cálcico en cultivos sumergidos en matraces.

Se trata de estudiar el efecto de cantidades de carbonato cálcico superiores a los 2 grs/100. Para ello se añaden a lo largo del período de desarrollo en fracciones sucesivas, cantidades que completen estos valores superiores, ya que la adición de una sola vez hasta de 8 grs por ciento fué objeto del ensayo precedente.

Los matraces que siempre hemos utilizado en cultivo su-

TABLA IX

Influencia de la cantidad de carbonato cálcico amorfo, añadido al medio de cultivo a los cuatro días de la inoculación. Cultivo superficial. Temperatura 32°C. Duración del cultivo: catorce días. pH inicial = 6.

CO ₂ Ca añadido grs/100 cc	Azúcar invertido		Materia seca		Acido fúndrico	Rendimiento	
	Inicial	Consumido	grs/100 cc	grs/100	grs/100	grs ac./100 grs azúcar consumido	
3	11	11	0,20	5			45
5	-	-	0,18	4			36
7	-	-	0,20	3,8			34
8	-	-	0,16	3,4			30
12	-	10,4	0,14	2,6			25

mergido son de vidrio pyrex de 500 cc. de capacidad, con 100 cc. de medio de cultivo. Se adaptan a un agitador-bandeja ya descrito y se desarrollan durante diez días a la temperatura de 32 °.

Con intervalos de dos a seis días se añaden a los matraces de esta serie: 0,15, 0,75, 1,0 y 2,0 grs de carbonato cálcico amorfo previamente esterilizado, hasta completar las cantidades de: 2,4 2,5, 3,3, y 4,0 grs. de carbonato cálcico por cada 100 cc. de medio de cultivo.

En la Tabla X aparecen los resultados correspondientes. Comentario.— En estas condiciones es decir, cuando el cultivo sumergido se lleva a cabo en matraces sobre agitador-bandeja tapados con algodón estéril, la adición de carbonato cálcico en cantidades superiores a los 2 grs por 100 cc. provoca un brusco descenso en la producción de ácido fumárico y llega a inhibir ésta totalmente.

Hay que hacer notar que la segunda adición de 2 grs de carbonato cálcico se hizo a los seis días cuando los primeros 2 grs. añadidos ya estaban disueltos. Como puede observarse en la Tabla X, la segunda adición de 2 grs. de carbonato cálcico suprime la producción de ácido, mientras que en un matraz testigo al que se mantuvo únicamente con 2 grs. de carbonato cálcico amorfo añadido a los tres días de desarrollo se consiguió un rendimiento del 12 por ciento de ácido fu

márico.

4ª. serie experimental.- Efecto que produce la adición al -
inocular o a los tres días de desarrollo de carbonato cálcico
amorfo en cultivo sumergido en matraces.

El medio de cultivo de J. M^a. Garrido (30) modificado
respecto a las concentraciones de sulfato férrico y sulfato
de cinc como describimos en la primera serie experimental de
este Capítulo, varía en cuanto a la concentración de sulfato
magnésico que en esta serie toma el valor de 0,01 grs/litro
en lugar de 0,06 grs/litro del citado medio de cultivo.

Al parecer el magnesio tiene un efecto acelerador en el
consumo de azúcar en cultivo superficial (22). Para evitar la
rápida pérdida de azúcar y conseguir de este modo aumentar el
rendimiento, se redujo la concentración de sulfato magnésico
observando además la influencia que ejerce el carbonato cálcico
añadido al tiempo de inocular o cuando el moho lleva
tres días de desarrollo en un medio de cultivo con pH inicial
igual a seis.

Los datos conseguidos en estas condiciones se detallan
en la Tabla XI.

Comentario.- Los primeros datos de la Tabla XI corresponden
a matraces que durante tres días se desarrollaron en un medio
de cultivo sin la presencia del agente neutralizante, como
puede comprobarse no se logra obtener ácido fumárico en esas

TABLA X

Adición de carbonato cálcico en fracciones sucesivas hasta conseguir valores superiores a 2 grs/100 cc de medio de cultivo. temperatura 32°C. Cultivo sumergido en mallas de 500 cc de capacidad en agitador-bandeja, durante diez días. pH inicial- 6.

CO ₂ Ca añadido grs/100 cc	Azúcar invertido		Acido fórmico grs/100	Rendimiento en grs ac. fórmico/ 100 grs azúcar cons.
	Inicial	grs/100 Consumido		
2,4	12,5	12,5	1,2	9,6
2,5	-	-	0	0
3,3	-	-	0	0
4,0	-	-	0	0

condiciones y el consumo de azúcar es también reducidísimo si se compara con el del matraz que durante esos tres primeros días de desarrollo estuvo en presencia de carbonato cálcico amorfo, produciendo una cantidad apreciable de ácido fumárico.

Con ésto se comprueba una vez más que sin agente neutralizante no se produce fumárico en cultivo sumergido, y que en tres días puede alcanzarse un rendimiento del 11 por ciento si se adiciona el neutralizante en cantidad adecuada. Estos rendimientos han sido ampliamente superados utilizando otro recipiente diseñado especialmente con este objeto, (véase Fig. 1).

Que el moho metaboliza el azúcar disponible en todos los casos, es evidente y por tanto se producen otros compuestos derivados de la degradación del carbohidrato que han podido comprobarse mediante cromatografía en papel y que se detallan en la segunda parte de esta Tesis. (Cap. VI)

Los resultados de la Tabla XI evidencian la marcha del proceso metabólico y aunque se haya aumentado el tiempo de cultivo, sólo se consigue reducir con ello los rendimientos ya que en un medio desprovisto de azúcar el fumárico es metabolizado por el microorganismo.

Los rendimientos que no exceden del 20 por ciento son debidos a la falta de adecuada aireación como se ha obser-

vado siempre en el cultivo sumergido en matraces.

5ª. serie experimental..- Comparación de dos tipos de carbonato cálcico amorfo de distinta pureza química.

En la tercera serie experimental de este Capítulo, observamos cómo cantidades de carbonato cálcico superiores a los 2 grs. por ciento, inhibían la producción de ácido fumárico totalmente.

Suponiendo que el carbonato cálcico aporta al medio de cultivo una excesiva cantidad de impurezas, utilizamos para comprobarlo con este ensayo como término de comparación, cantidades iguales de carbonato cálcico Merck, reactivo de análisis, formando dos series simultáneas que con el medio de cultivo habitual se diferencian por la adición al tiempo de inocular de 2 grs. por ciento de carbonato cálcico Merck en un caso y en la otra serie de la misma cantidad de carbonato cálcico reactivo de análisis de menor pureza.

En estos medios de cultivo en que se mantienen las concentraciones de todas las sales que integran el medio de Garrido, no se adiciona ni sulfato férrico ni sulfato de cinc con objeto de comprobar la influencia de los elementos trazas que se incorporan con el neutralizante.

Los datos de la Tabla XII permiten observar la influencia de ambas calidades de carbonato cálcico en cultivo sumergido. Las condiciones de cultivo sumergido repetidamente des-

TABLA XI

Influencia de la mínima concentración de sulfato magnésico (0,01 grs/litro) y del período de desarrollo, en presencia de CO_2 Ca. Cultivo sumergido en matraces de 500 cc.

Tiempo de cultivo en días	Azúcar invertido		Materia seca grs/100	Acido fumárico grs/100	Reminiente en grs.ac.fumárico/ 100 grs azúcar cons
	Inicial	Consumido grs/100 cc			
Adición de CO ₂ Ca, 2 grs/100 cc de medio, a los 3 días de incubación					
3	11,7	0,5	---	---	---
6	--	8,3	0,47	0,4	4,8
9	--	11,6	0,50	1,85	15
12	--	11,5	0,42	2,0	17
15	--	11,5	0,55	2,3	20
Adición de CO ₂ Ca, 2 grs al tiempo de inocular a 100 cc de medio					
3	11,7	4,6	0,27	0,51	11
6	--	11,6	0,4	1,7	14
9	--	11,6	0,5	1,9	16
12	--	11,6	0,47	1,8	15
15	--	11,6	0,22	2,4	20

critas son: matraces vidrio Pyrex de 500 cc. en agitador-bandeja a 72 r.r.m. temperatura 34° pH inicial 6. La duración total del cultivo es de veinte días tomando muestras cada cuatro días.

Comentario.- En los datos de la Tabla XII se observa un continuo aumento de la producción de fumárico en las muestras sucesivas. El consumo de azúcar es muy rápido y en los datos correspondientes a cuatro días de incubación, se advierte que el consumo es más completo en la serie neutralizada con carbonato cálcico de menor pureza.

Ya que los mejores rendimientos no se obtienen con el producto Merck, puede suponerse que las impurezas aportadas al medio de cultivo por el neutralizante favorecen el desarrollo del microorganismo y la producción de ácido.

6ª. serie experimental.- Aplicación del polvo de marmol (carbonato cálcico cristalizado) como neutralizante.

En las series anteriores que se refieren a cultivo sumergido, comprobamos las ventajas y desventajas del empleo en nuestros medios de cultivo de carbonato cálcico amorfo con pureza química inferior a la del producto Merck.

En este ensayo aplicamos como neutralizante polvo de marmol finamente dividido.

Se emplean matraces de vidrio Pyrex en las condiciones habituales de cultivo sumergido ya descrito.

TABLA XII

Comparación de dos tipos de carbonato cálcico amorfo, de distintas puresas, en cultivo sumergido en matraces. Muestras cada cuatro días. Adición al tiempo de inocular de 2 grs./100 cc. de uno de los dos neutralizantes. pH inicial = 6.

Tiempo de cultivo en días	Azúcar invertido grs/100	Acido fumárico grs/100	Rendimiento en grs ac.fumárico/100
Inicial	Consumido		grs azúcar consumidos
Adición de 2 grs/100 cc. de CO ₂ Ca Merck.			
4	14,5	11,3	1,75
8	"	12	0,70
12	"	14	1,50
16	"	14	1,4
20	"	14	1,7
Adición al inocular de 2 grs/100 cc. de CO ₂ Ca de menor pureza.			
4	14,5	12	1,1
8	"	14,5	1,9
12	"	14,3	2,0
16	"	14,4	2,5

El medio de cultivo de Garrido se modifica respecto a las concentraciones de hierro y cinc que son 0,07 grs/litro de sulfato férrico amónico y 0,0035 grs/litro de sulfato de cinc.

A los dos días de incubación se añade a cada pareja de matraces las siguientes cantidades de polvo de mármol estéril: 2,0, 2,5, 3,0, 4,0 y 5,0 grs/100 cc. de medio.

Comentario.— A los diez días de cultivo el consumo de azúcar invertido fué completo en todos los casos.

El rendimiento en ácido fumárico calculado sobre azúcar consumido alcanza el valor medio de 23 por ciento.

Se pudo comprobar sin embargo un extremo muy interesante para la aplicación como neutralizante del polvo de mármol, porque aún en cantidades del 5 por ciento no inhibía el desarrollo como en las mismas condiciones sucede con el carbonato cálcico amorfo. Todavía no conseguimos aumentar los rendimientos de cultivo sumergido a los valores alcanzados en cultivo superficial, pero este nuevo tipo de neutralizante reúne las características de pureza suficiente y mayor insolubilidad y reactividad que le hacen particularmente apto para su uso en cultivo sumergido. Otra ventaja muy digna de tenerse en cuenta desde el punto de vista industrial es la baratura del polvo de mármol y su fácil manipulación para añadirlo a grandes fermentadores, etc.

7ª. serie experimental..- Estudio de la influencia del neutralizante (polvo de mármol o carbonato sódico 4N), respecto al tiempo y a la fuente de nitrógeno en cultivo superficial.

El medio de cultivo empleado en este ensayo es el siguiente:

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,18	grs/litro.
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,06	id.
SO_4K_2	0,06	id.
$(\text{SO}_4)_2\text{FeNH}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,12	id.
$\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0035	id.
sacarosa invertida neutralizada	130,00	id.

Las fuentes de nitrógeno ensayadas en esta serie son: nitrato amónico y urea en cantidades equivalentes a la concentración de sulfato amónico que figura en el medio original.

Una serie de matraces de 100 cc de capacidad con 25 cc de medio cada uno, se neutraliza a los tres días de la inoculación con polvo de mármol (CO_3Ca cristalizado) estéril a razón de 5 grs por cada 100 cc de medio. Otra serie idéntica se neutraliza diariamente con la cantidad de $\text{CO}_3\text{Na}_24\text{N}$ precisa para mantener el pH en los límites adecuados (entre 5 y 6). Este pH óptimo se evidencia por el indicador rojo de metilo (6). Finalmente una tercera serie se mantiene como testigo sin

adición de neutralizante durante todo el proceso.

La temperatura es de 32°C. Tiempo de incubación diez días tomando muestras (dos matraces que se analizan conjuntamente) cada dos días de cada una de las series descritas.

Los resultados del ensayo con nitrato amónico como fuente de nitrógeno se muestran en la Tabla XIII correspondiendo los datos a matraces que se analizan antes de añadir ningún neutralizante, esto es a los tres días de cultivo.

Análogamente los datos de la Tabla XIV corresponden al medio de cultivo con urea, en sustitución del sulfato amónico.

La notación empleada en dichas Tablas consiste en:

Medios 1A, 2A y 3A correspondientes al ensayo con nitrato amónico pero neutralizados con, respectivamente:

El nº 1 con polvo de mármol estéril.

El nº 2 con carbonato sódico 4 normal, usando rojo de metilo como indicador.

El nº 3 significa la serie mantenida sin adición de ningún tipo de neutralizante.

Del mismo modo la notación 1B, 2B y 3B que aparece en la Tabla XIV significa medios de cultivo con urea y neutralizados con polvo de mármol, CO_3Na_2 4N o sin neutralizar.

Comentario.— Los valores de la Tabla XIII que corresponde a

medios con nitrato amónico en sustitución del sulfato amónico, muestran los rendimientos más elevados cuando se neutralizan con polvo de mármol estéril. La neutralización con CO_3Na_2 4N en presencia de un indicador como rojo de metilo, no resulta muy eficaz y solamente a los ocho días de cultivo puede lograrse un mediocre rendimiento (15 por ciento). El consumo de azúcar es reducido en la serie sin neutralizar. Esto revela que para poderse efectuar completamente, necesita la presencia de un neutralizante y que la clase de éste es un extremo importante, ya que la neutralización paulatina con CO_3Na_2 4N adicionado siempre que el indicador mostraba un pH ácido, no basta para mantener el pH en condiciones favorables a la producción de fumérico. Sin embargo en instalaciones industriales de grandes fermentadores existen dispositivos que automáticamente adicionan el carbonato sódico siempre que el pH se desplaza hacia la zona ácida y entonces este neutralizante puede ser de utilidad industrial y fácil manejo.

El polvo de mármol permanece en el medio durante todo el proceso, se va disolviendo conforme se produce fumérico para convertirse en fumarato cálcico y en este ensayo resulta más conveniente que los otros neutralizantes probados.

La influencia de la fuente de nitrógeno se advierte en el bajo rendimiento (del 31 por ciento); como se observó en el Capítulo III de esta Tesis, no resulta tan favorable a

la producción de fumárico el nitrato amónico como la urea o el sulfato amónico.

En la Tabla XIV aparecen los datos que corresponden a la serie paralela en que se usa la urea como fuente de nitrógeno y en presencia de los neutralizantes citados (polvo de mármol y carbonato sódico 4N). La influencia del tipo de neutralizante se observa también con características análogas a las que comentamos en la Tabla XIII es decir, más favorable al empleo de polvo de mármol que el carbonato sódico 4N.

En ambas Tablas la serie que se mantiene sin neutralizar a lo largo del desarrollo del moho, no produce ácido fumárico en cantidad apreciable comprobándose que si en el medio de cultivo durante el proceso de fermentación no existe un neutralizante que se combine con el ácido conforme se va produciendo a partir de la glucosa, los valores ácidos del pH inhiben el proceso metabólico, el desarrollo del microorganismo, etc. Tanto en cultivo sumergido, veánse series anteriores, como en cultivo superficial de la de que es prueba la presente serie experimental, es necesario añadir al medio de cultivo durante el desarrollo del moho, un neutralizante que mantenga el pH en el valor conveniente al proceso de la fermentación fumárica.

TABLA XIII

Influencia del polvo de mármol ó el carbonato sódico 4N, sobremedios de cultivo con nitrato amónico, en cultivo superficial. Muestras tomadas cada dos días. Temperatura 32°C.

=====									
Notación medios de cultivo	Tiempo de cultivo en días	Azúcar invertido		Materia seca		Acido fúmfico		Rendimient	
		Inicial	Consumido	grs/100	grs/100	grs/100	grs/100	grs so./100	grs azu.cons
1A	3	13	3,8	0,06	0	0	0	0	0
2A	6	-	6,5	0,52	1,8	0	0	27	0
3A	6	-	7,1	0,28	0	0	0	0	0
	6	-	3,9	0,04	0	0	0	0	0
1A	8	-	9,4	0,54	2,6	0	0	27	0
2A	8	-	8,0	0,36	1,2	0	0	15	0
3A	8	-	4,0	0,05	0	0	0	0	0
1A	10	-	12,3	0,55	4,0	0	0	31	0
2A	10	-	8,5	0,20	0,4	0	0	5	0
3A	10	-	5,4	0,18	0	0	0	0	0

TABLA XIV

Influencia del polvo de mármol ó el carbonato sódico 4N, sobre medios de cultivo con urea en cultivo superficial. Muestras tomadas cada dos días. Temperatura 32°C.

Notación medios cultivo	Tiempo de cultivo en días	Azúcar invertido		Materia seca grs/100	Acido fúndrico grs/100	Rendimiento grs fundríco/ 100 grs asu. cons
		Inicial	Consumido grs/100			
	3	13	6,8	0,30	0,18	2
1B	6	-	11,0	0,68	2,4	21
2B	6	-	11,0	0,58	1,6	14
3B	6	-	8,8	0,48	0,18	2
1B	8	-	12,7	0,70	3,8	29
2B	8	-	13,0	0,68	0,9	6
3B	8	-	9,4	0,40	0,2	2
1B	10	-	13,0	0,96	6,0	46
2B	10	-	12,6	0,60	1,0	8
3B	10	-	9,2	0,52	0,3	3

8ª. serie experimental.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA
DEL NEUTRALIZANTE (polvo de mármol o carbonato sódico 4N) RESPECTO AL TIEMPO Y LA FUENTE DE NITROGENO.
CULTIVO SUMERGIDO EN MATRACES.

El medio de cultivo utilizado se detalla en la serie anterior (7ª serie experimental del Cap. IV de esta Tesis).

Las fuentes de nitrógeno utilizadas son la urea y el nitrato amónico, en cantidades equivalentes a la concentración del sulfato amónico que figura en el medio original, (30).

A una serie de matraces de 500 cc. de vidrio Pyrex, con 100 cc. de medio de cultivo se añade para la neutralización a los tres días de cultivo, 5 grs. por cada 100 cc. de medio de polvo de mármol estéril, mientras que otra serie idéntica se neutraliza con $\text{CO}_3\text{Na}_24\text{N}$ en presencia de rojo de metilo, mediante adiciones sucesivas del álcali. Finalmente una serie preparada en las mismas condiciones se mantiene sin neutralizar y sirve de testigo para los efectos de ambos neutralizantes.

La temperatura se mantiene en 32°C. El tiempo de cultivo total son diez días, tomando muestras cada dos días pH. inicial del medio=6.

La notación de los medios es la siguiente: 1A, 2A y 3A

para los medios con nitrato amónico significando los coeficientes el tipo de neutralizante usado que es respectivamente: el 1 mármol, el 2 $\text{CO}_3\text{Na}_24\text{N}$ y el 3 sin neutralizar. En la serie con urea se mantiene la misma notación significando en este caso la letra B, el tipo de fuente de nitrógeno.

Los resultados del medio con nitrato amónico pueden observarse en la Tabla XV los correspondientes al medio con urea en la Tabla XVI.

Este cultivo sumergido se verifica en matraces, tapados con algodón estéril y agitados en el agitador-bandeja repetidamente citado.

Comentario.— En las Tablas XV y XVI, se observa de nuevo que el efecto del polvo de mármol estéril es más favorable a la producción de ácido fumárico en cultivo sumergido, que el del carbonato sódico 4N adicionado sucesivamente frente a un indicador como rojo de metilo y mucho más que cuando al medio de cultivo no se añade ningún neutralizante a lo largo de todo el proceso.

La serie con urea demuestra que este compuesto nitrogenado mantiene el pH en valores más adecuados durante los primeros 3 días de desarrollo y permite por tanto, como se observó en cultivo superficial, alguna producción de fumárico antes de añadir al agente neutralizante y en la serie sin neutralizar. No obstante, el intenso consumo de azúcar impide que el

rendimiento alcance valores considerables.

El consumo de azúcar es menor en las series neutralizadas con carbonato sódico 4N, pero es mucho menor todavía - cuando no se añade ningún neutralizante. Esto parece indicar que las enzimas necesarias para la degradación del azúcar en el moho *Rh.oryzae*, no actúan a pH ácidos y que el mantenerle en los límites óptimos de manera constante, es fundamental para la producción del ácido fumárico por este microorganismo.

Los valores reseñados en las Tablas y que no superan al 23 % en el rendimiento, valor que no se pudo elevar en las condiciones de trabajo hasta aquí descritas, se deben sin duda a la falta de aireación y a la carencia del sistema enzimático apto para metabolizar correctamente el azúcar en condiciones próximas a la anaerobiosis, ya que en cultivo su perficial los valores con el mismo medio y la misma cepa llegan hasta el 46 %.

TABLA XV

Influencia del polvo de mármol ó el carbonato sódico 4N, sobre medios de cultivo con nitrato amónico, cultivo sumergido en matraces. Muestras tomadas cada 24 horas. Temperatura 32°C

Notación m medios de cultivo	Tiempo de cultivo días	Azúcar invertido grs/100		Materia seca grs/100	Ácido fúrmico grs/100	Rendimiento grs áe./100 grs azuc.cons.
		Inicial	Consumido			
	3	13	3	0,22	0	0
1A	6	-	7,2	0,30	0,86	12
2A	6	-	5,5	0,22	0,22	4
3A	6	-	5,4	0,16	0	0
1A	8	-	8,5	0,29	1,6	19
2A	8	-	8,2	0,33	0	0
3A	8	-	4,7	0,12	0	0
1A	10	-	10,2	0,32	2,4	23
2A	10	-	9,4	0,28	0,6	7
3A	10	-	6,5	0,40	0	0

TABLA XVI

Influencia del polvo de mármol ó el carbonato sódico 4N sobre medios de cultivo con urea, cultivo sumergido en matraces. Muestras tomadas cada dos días. Temperatura 32°C.

Notación medios cultivo	Tiempo de cultivo días	Azúcar invertido grs/100		Materia seca grs/100	Acido furfúrico grs/100	Rendimiento grs ác./100 grs azúcar cons.
		Inicial	Consumido			
	3	13	5,9	0,26	0,47	8
1B	6	-	12,0	0,45	0,82	7
2B	6	-	3,4	0,37	1,0	10
3B	6	-	5,9	0,30	0	0
1B	8	-	12,0	0,54	0,45	3
2B	8	-	11,4	0,34	0	0
3B	8	-	9,0	0,32	0	0
1B	10	-	12,0	0,13	1,3	11
2B	10	-	11,1	0,33	0	0
3B	10	-	9,2	0,30	0	0

CAPITULO IV.

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SULFATO AMONICO Y DE OTRAS SALES NITROGENADAS.

Parte teórica.

Las proteínas tienen vital importancia en el mantenimiento de la estructura y la integridad funcional de todas las formas biológicas. Todos los datos sobre la formación de proteínas en sistemas biológicos indican que los aminoácidos y sus derivados sirven como precursores de las proteínas, pero la síntesis de proteínas a partir de aminoácidos es un proceso endergónico y debe tomar la energía requerida de los procesos productores de la misma en la degradación oxidativa de carbohidratos y grasas.

Refiriéndonos al metabolismo nitrogenado en microorganismos conviene observar que el amoníaco es también compuesto clave en su metabolismo y que cuando dispone de compuestos de carbono, azufre y fósforo, además de otros indispensables nutrientes, pueden utilizar fácilmente el amoníaco como principal fuente de nitrógeno proteínico.

A.oryzae transforma el grupo amónico en grupo amino rápidamente; en un medio con glucosa y sulfato amónico produce alanina, serina, ácido aspartico, ácido glutámico, glicocola y arginina.

La síntesis de proteínas en microorganismos (28) parte de los aminoácidos previamente suministrados o sintetizados

a espensas del amoníaco, sales nitrogenadas y compuestos hidrocarbonados del medio de cultivo. Entre las bacterias es curioso señalar que las Gram-negativas, pueden utilizar el amoníaco como única fuente de nitrógeno y en cambio la mayoría de las Gram-positivas requieren la presencia de aminoácidos preformados.

Se supone que el nitrógeno debe estar en forma amoniacal para ser absorbido por las plantas y que las otras sales nitrogenadas que pueden suministrarse han de convertirse para su asimilación en amoniacales y dar así lugar a los compuestos orgánicos con nitrógeno necesarios para la formación del micelio, etc.

Los compuestos nitrogenados demostrados en los mohos se refieren a aminoácidos y proteínas, ácidos nucleicos y otros más complicados.

En el micelio de *Rh. nigricans*, *A. niger*, *P. notatum*, Stokes y Gunness (79) comprobaron la presencia de histirina, arginina, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, treonina, fenilalanina y triptófano.

La síntesis de proteínas por la masa miceliar de los mohos sugirió la posibilidad de utilizarlos como fuentes de proteínas de manera análoga a las levaduras pienso y sobre la toxicidad de estos micelios y su poder nutritivo existen varios trabajos (85, 73, 88).

Otros compuestos como ácidos nucleicos han sido estudiados en *P. glaucum* y *A. cryzae* (86, 2) y sustancias nitrogenadas como la betaina y su derivado *n*-metilprolina metilbetaina, se han aislado de micelios de mohos.

En ensayos con microorganismos productores de ácido cítrico, láctico y grasa la influencia de la fuente de nitrógeno usada así como su concentración, es objeto de interesantes estudios.

Resultados de las experiencias con productos de reducción del ácido nítrico indican (78) que el *A. niger* únicamente utiliza los grupos amónicos para la formación de compuestos orgánicos nitrogenados. Otras fuentes de nitrógeno se convierten en nitrógeno amónico antes de ser asimiladas y su valor nutritivo es proporcional a la cantidad y a la velocidad con que se verifique esta conversión.

En la producción de ácido cítrico en cultivo sumergido (70) se establece que el nitrato amónico es la mejor fuente de nitrógeno para la máxima producción de ácido cítrico. Su concentración óptima es de 2,5 grs/litro.

También en la producción de grasas por *P. javanicum* van Beijma (49) se comprueba como óptima la concentración de nitrato amónico de 2,25 grs/litro y los mismos autores (50) trabajando con una cepa de *Rh. cruzae* productora de ácidos lácticos y fumárico, el primero en mayor cantidad,

comprueban que las concentraciones superiores a 6 grs/litro de nitrato amónico inhibe la producción de fumárico, siendo más favorable la de 0.75 grs/litro. En el mismo trabajo se ensaya también el efecto de distintas fuentes nitrogenadas tales como nitrato sódico, nitrito sódico, sulfato amónico, d-l-alanina, ácido d-glutámico, urea glicocola y peptona. Sus observaciones muestran una vez más que este organismo usa amoníaco y nitrógeno amínico pero no el nitrógeno de los nitratos, asimilando escasamente el procedente de los nitritos.

Las cepas de *Rhizopus* desarrollan rápidamente sobre medios con glucosa y sales nitrogenadas inorgánicas. Sin embargo, como muchos miembros de los Mucorales, estos microorganismos no pueden utilizar el nitrógeno de los nitratos sino el suministrado en forma de sales amónicas. También utilizan otras formas de nitrógeno de compuestos orgánicos tales como urea, pero se supone que estas sustancias liberan amoníaco en cuya forma es asimilable el nitrógeno. Ordinariamente para el cultivo de *Rhizopus* y la producción de ácido fumárico se utiliza el cloruro o sulfato amónico como fuentes de nitrógeno.

Waksman (90) establece la conveniencia del sulfato amónico como fuente de nitrógeno y marca los amplios límites de 200 a 500 mgrs/litro cuando la concentración de carbohidrato

es de 50 a 150 grs/litro. En uno de los medios detallados en su patente establece la concentración de sulfato amónico de 0,2 grs/litro.

La relación C/N del medio de cultivo tiene una importancia crucial en la formación de ácido fumérico. Cuando el valor de esta relación es bajo, las condiciones son favorables y Waksman establece la zona óptima de producción entre los valores del C/N de 25/1 y 300/1, advirtiéndole la influencia que sobre la producción tiene en todos los casos la concentración de Zn cuya influencia se reduce notablemente cuando la relación C/N es alta.

En nuestro estudio hemos investigado la concentración óptima para el microorganismo usado de nitrógeno, en forma de sulfato amónico únicamente, ya que el cloruro amónico perturbaría el método de análisis cuantitativo de ácido fumérico (nitrato mercurioso al 10 por ciento en ácido nítrico al 5 por ciento). Hemos comprobado también la relación C/N tanto en cultivo superficial como sumergido, observando notables diferencias e interviniendo en esto la aireación del medio.

Asimismo hemos estudiado distintas fuentes de nitrógeno, comprobando en la Parte Experimental de este Capítulo, las observaciones anteriores en cuanto a la ineficacia de los nitratos como suministradores de nitrógeno al organismo ensayado y la utilidad de las sales amoniacaes y la urea.

PARTE EXPERIMENTAL.

1ª. serie experimental.- Variaciones en la concentración de sulfato amónico en cultivo superficial.

Para establecer la relación más favorable entre las concentraciones de carbohidrato y sulfato amónico, que permitan obtener el máximo rendimiento en ácido fumárico, tanto el cultivo superficial como en cultivo sumergido; se ensayan en esta serie y únicamente en cultivo superficial las concentraciones siguientes de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$:

0,5, 1, 2,3 y 5 grs/litro, manteniendo constante todas las concentraciones del resto de las sales que forman el medio original.

Las concentraciones de carbohidrato (sacarosa invertida) son las siguientes:

6, 8, 10 y 12, 14 grs/100 cc.

Por tanto, se estudian veinticinco medios de cultivo que resultan de la combinación de ambas concentraciones, reuniendo en las Tablas IX al XIII los resultados frente a cada concentración de sacarosa por una determinada concentración de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

El tiempo de cultivo es el mismo para todas las muestras y se realiza en diez días. El pH inicial igual a 6 y la temperatura se mantiene a 34°C. La adición de polvo de mármol, (CO_3Ca cristalizado) se efectúa a los tres días de desarrollo y en la concentración del 5 por ciento (5 grs. por cada 100 cc

de medio de cultivo).

Comentario.— En la Tabla XVII se advierte que la concentración de sulfato amónico de 0,5 grs/litro, resulta insuficiente para que el rendimiento supere al 33 por ciento. Las concentraciones de sacarosa invertida superiores e inferiores a las del 10 por ciento consiguen menores rendimientos en ácido fumárico. Existe pues como en el caso de los fosfatos, un equilibrio C/N y en la concentración de 0,5 grs/litro no se obtiene dicho equilibrio favorable a la producción de ácido fumárico con ninguna de las concentraciones de azúcar ensayadas. Como veremos en series posteriores la concentración de glucosa correspondiente a la de sulfato amónico que comentamos ha de ser menor del 6 por ciento.

Los valores que aparecen en la Tabla XVIII y que corresponden a medios de cultivo con 1,0 grs/litro de sulfato amónico frente a las concentraciones citadas de azúcar invertido, muestran un máximo en el rendimiento de ácido fumárico (45 por ciento) que corresponde al 8 por ciento de azúcar invertido. Mayores concentraciones de azúcar no aumentan el rendimiento y la influencia de la concentración de sulfato amónico se advierte comparando con la Tabla XVII, en que el consumo total de azúcar es mucho mayor. En la concentración de 14 por ciento de azúcar invertido, comprobamos que el consumo al final del ensayo es casi el doble del que aparece para la misma con-

concentración inicial en la Tabla XVII es decir, cuando la concentración de sulfato amónico es de 0,5 grs/litro.

En la Tabla XIX hay un desplazamiento del máximo rendimiento hacia la concentración de azúcar invertido correspondiente al 10 por ciento. Llega a alcanzarse el mayor rendimiento de esta serie experimental es decir, el 47 por ciento de ácido fumárico sobre azúcar consumido. El consumo de azúcar es bastante completo para todas las concentraciones ensayadas, demostrando que las concentraciones de sulfato amónico más convenientes para la producción de ácido fumárico en las condiciones que tratamos están comprendidas entre 1 y 3 grs/litro, y la concentración de azúcar invertido entre los límites del 8 al 12 por ciento.

Estas conclusiones se desprenden también del estudio de las Tablas XX y XXI donde puede observarse un descenso en los rendimientos al aumentar la concentración de sulfato amónico frente a todas las concentraciones probadas de azúcar invertido. Unicamente los pesos de materia seca que revelan el desarrollo miceliar aumentan considerablemente en relación a las otras Tablas, en esta ocasión también se repite la observación de que un desarrollo miceliar exuberante no se traduce en muchos casos en una mejor producción de ácido fumárico y que el cociente C/N es decisivo para obtener buenos rendimientos del ácido.

TABLA XVII

Influencia de la concentración de 0,5 grs/litro de sulfato amónico, en cultivo superficial frente a distintas concentraciones de azúcar inicial. pH inicial= 6. Adición de 5 % de pol-vo de málmal estéril a los tres días de incubación. Temperatura 32°C. Tiempo cultivo: 10 días

Inicial	Azúcar invertido		Materia seca Grs/100	Acido fórmico grs/100	Rendimiento en grs ácido/100 grs azúcar consumido
	grs/100	Consumido			
6	5,7		0,18	1,6	28
8	6,4		0,12	1,8	28
10	6,6		0,08	2,2	33
12	7,3		0,24	1,8	23
14	7,7		0,16	1,5	19

TABLA XVIII

Influencia de la concentración de 1,0 grs/litro de sulfato amónico frente a distintas concentraciones de azúcar inicial, en cultivo superficial. PH inicial= 6. Adición de 5 % de polvo de mármol esteril a los tres de incubación. Temperatura 32°C. Tiempo de cultivo: 10 días.

	Azúcar invertido grs/100 de Inicial Consumido	Materia seca grs/100	Acido fumarico grs/100	Rendimiento en grs ácido/100 grs azúcar consumido.
6	5,9	0,34	2,2	37
8	8,0	0,32	3,6	45
10	9,0	0,36	3,6	40
12	10,3	0,40	3,9	38
14	13,0	0,28	3,3	23

TABLA XIX

Influencia de la concentración de 2,0 grs/litro de sulfato amónico frente a distintas concentraciones de azúcar inicial, en cultivo superficial. pH inicial= 6. Adición de 5% de polvo de mármol estéril a los tres días de incubación. Tiempo de cultivo total: 10 días.

Inicial	Azúcar invertido grs /100 cc Consumido	Materia seca grs/100 cc	Acido fundrico grs/100	Rendimiento grs ácido/100 grs azúcar consumido.
6	5,9	0,70	1,4	24
8	8,0	0,48	2,8	35
10	9,8	1,06	4,6	47
12	11,4	0,68	3,8	33
14	11,4	0,78	3,4	28

TABLA XX

Influencia de la concentración de 3,0 grs/litro de sulfato amónico frente a distintas concentraciones de asdear inicial, en cultivo superficial. pH inicial= 6. Adición de 5 % de polvo de mármol estéril a los tres días de incubación. Temperatura 32°C. Tiempo total de cultivo: diez días.

Inicial	Asdear invertido	Materia seca	Acido fundrico	Rendimiento
	grs/100 Consumido	grs/100	grs/100	grs acido/100 grs asdear consumido.
6	5,9	0,72	1,4	24
8	7,8	0,92	2,4	27
10	9,9	0,94	3,2	30
12	11,3	0,98	3,5	30
14	11,0	1,32	1,5	13

TABLA XXI

Influencia de la concentración de 4,0 grs/litro de sulfato amónico frente a distintas concentraciones de azúcar inicial, en cultivo superficial. pH inicial= 6. Adición de 5 % de polvo de mármol estéril a los tres días de incubación. Temperatura 32°C. Tiempo de cultivo total: diez días.

Azúcar invertido grs/100	Materia seca grs/100	Acido fumárico grs/100	Rendimiento grs ácido/100 grs azúcar consumido
Inicial	Consumido		
6	6	0,82	0
8	8	1,2	27
10	10	1,4	36
12	12	1,2	35
14	12,5	0,9	32

2ª. serie experimental.- Variaciones en la concentración de sulfato amónico en cultivo sumergido en matraces.

Sobre el medio base empleado en todos los ensayos precedentes, se ensayan las siguientes concentraciones de sulfato amónico: 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 y 4,0 grs/litro.

Cada una de ellas se prueba frente a las siguientes - concentraciones de azúcar invertido: 6, 8, 10, 12 y 14 grs/100 cc. de medio de cultivo.

De la combinación de estas dos series de concentraciones se producen veinticinco medios distintos, que se estudian en cultivo sumergido empleando matraces de vidrio Pyrex de 500 cc. de capacidad, con 100 cc. de medio cada uno.

Como en la serie anterior de este Capítulo la temperatura se mantiene en 34° durante los diez días de incubación en el agitador-bandeja. El polvo de mármol estéril a razón de 5 grs por cada 100 cc. de medio se añade al inocular.

Los resultados obtenidos en las anteriores condiciones se muestran en las Tablas XXII al XXVI.

Comentario.- En la Tabla XXII correspondiente a la concentración de 0,5 gres/litro de sulfato amónico, se advierte frente a las distintas concentraciones de azúcar invertido una regularidad en los rendimientos de ácido fumárico. El dato de más valor absoluto corresponde a la concentración de azúcar invertido del 8 por ciento, aunque calculando el rendimien

to sobre azúcar consumida sea más elevado el que se obtiene con la concentración del 14 por ciento. Las diferencias entre cultivo superficial y sumergido en matraces, se aprecian claramente si comparamos estos rendimientos (Hasta del 34 por ciento), con los obtenidos en las Tablas XXII al XXVI.

Mantener un equilibrio entre las concentraciones de sulfato amónico y azúcar invertido en el medio inicial y a lo largo del proceso de fermentación, aparece en cultivo sumergido como de capital importancia. La inhibición ejercida por el sulfato amónico en concentraciones superiores a 1 grs/litro cuando el azúcar disponible no excede del 10 por ciento, es verdaderamente notable. En la Tabla XXIV se comprueba la falta de producción de ácido fumárico en medios de cultivo que contienen 6 y 8 gres por ciento de azúcar invertido y 2 grs/litro de sulfato amónico. Esta inhibición que afecta decisivamente a la producción de fumárico sigue ejerciéndose con más intensidad si la concentración de sulfato amónico es de 3 grs/litro. En este caso aunque la concentración de azúcar invertida sea inicialmente del 10 por ciento tampoco se produce ácido fumárico como puede observarse en la Tabla XXV.

Y en la Tabla XXVI se repite el hecho observado con menores concentraciones de sulfato amónico ya que en esa Tabla se recogen los resultados obtenidos con medios de cultivo que contienen 4 grs/litro de sulfato amónico. La inhibición alcan

sa en este caso hasta concentraciones de azúcar invertido en el medio inicial del 12 por ciento.

En cultivo superficial esta inhibición por acción de elevadas concentraciones de sulfato amónico, sólo se muestra en la Tabla XXI cuando la concentración de sulfato amónico es de 4 grs/litro y la de azúcar invertida de 6 por ciento. Los rendimientos son incomparables en ambos tipos de cultivo.

Estos hechos se explican cuando adoptamos otros recipientes para cultivo sumergido (véase Fig. 1) demostrando cómo la falta de adecuada aireación en los matraces de 500 cc de capacidad, con 100 cc de medio de cultivo, es la causa de los bajos rendimientos obtenidos en cultivo sumergido. Conseguida una agitación óptima y la conveniente aireación, los rendimientos en cultivo superficial pueden alcanzarse y aún superarse en cultivo sumergido, con todas las ventajas que el sumergido tiene sobre el superficial en cuanto a brevedad del tiempo de cultivo, mayor volumen fermentado y fácil manipulación de los recipientes que le posibilitan para su aplicación a la producción industrial.

TABLA XXII

Influencia de la concentración de 0,5 grs/litro de sulfato amónico en cultivo sumergido, frente a distintas concentraciones de azúcar inicial. Temperatura 32°C. Adición de 5 % de polvo de mfrzol estéril al tiempo de inocular. pH inicial- 6. Tiempo total de cultivo: 10 días

	Azúcar invertido		Materia seca	Acido fumárico		Rendimiento
	Inicial	grs/100 Consumido	grs/100	grs/100	grs deido/100 grs azúcar consumido	
6		5,4	0,28	1,6		29
8		7,1	0,40	2,1		29
10		6,2	0,33	1,9		30
12		6,3	0,26	1,9		30
14		4,9	0,19	1,7		34

TABLA XXIII

Influencia de la concentración de 1,0 grs/litro de sulfato amónico frente a distintas concentraciones de azúcar inicial, en cultivo sumergido. Temperatura 32°C. Adición de 5 % de po vo de mármol estéril al tiempo de inocular. pH inicial. 6. Tiempo total de cultivo; 10 días.

Azúcar invertido grs/100 Inicial	Consumido	Materia seca grs/100	Acido fundrico grs/100	Rendimiento grs deido/100 grs azúcar consumido
6	6	0,30	1,6	26
8	7,8	0,34	2,2	28
10	8,6	0,35	2,6	30
12	10,5	0,44	2,5	22
14	9,2	0,31	2,2	23

TABLA XXIV

Influencia de la concentración de 2,0 grs/litro de sulfato amónico a distintas concentraciones de azúcar inicial, en cultivo sumergido. Temperatura 32°C. Adición de 5 % de polvo de azúcar estéril al inocular. pH inicial- 6. Tiempo total de cultivo: 10 días.

	Azúcar invertido		Materia seca	Acido fumárico		Rendimiento grs ácido/100 grs azúcar consumido
	Inicial	Consumido	grs/100	grs/100		
6	5,9		0,20	0		0
8	7,9		0,44	0		0
10	9,8		0,46	1,0		10
12	12,2		0,50	1,5		13
14	12,8		0,40	1,3		10

TABLA XXV

Influencia de la concentración de 3,0 grs/litro de sulfato amónico frente a distintas concentraciones de asdear inicial, en cultivo sumergido. Temperatura 32°C. Adición de 5 % de peso de mármol esteril al inocular. pH inicial. 6. Tiempo total de cultivo: diez días.

	Asdear invertido grs/100 Inicial	Materia seca grs/100	Acido fundrico grs/100	Rendimiento grs ácido/100 grs asdear consumido
6	5,9	0,48	0	0
8	8,0	0,80	0	0
10	9,9	0,32	0	0
12	11,8	0,60	0,25	2
14	13,5	0,51	1,0	7

T A B L A XXVI

Influencia de la concentración de 4,0 grs/litro de sulfato amónico frente a distintas concentraciones de azúcar inicial, en cultivo sumergido. Temperatura 32°C. Adición de 5% de polvo de marmol estéril al inocular. pH inicial = 6. Tiempo total de cultivo: diez días.

Azúcar invertido		Materia seca grs/100	Acido fundrico grs/100	Rendimiento grs. ácido/100 grs Azúcar consumido
Inicial	Consumido			
6	6	0,58	0	0
8	8	0,62	0	0
10	9,9	0,70	0	0
12	11,9	0,84	0	0
14	13,2		1,1	0

3ª. serie experimental..- Variaciones en la concentración de sulfato amónico en cultivo sumergido en nuevos recipientes.

Para comprobar la influencia que la agitación y la aireación del medio de cultivo conseguida en los nuevos recipientes, pueda tener sobre la inhibición ejercida por altas concentraciones de sulfato amónico como se observó en las Tablas que recogen los resultados de anteriores series experimentales, se preparan los siguientes medios de cultivo:

Medios 1, 2, 3 y 4 con 0,5 grs/litro de sulfato amónico frente a 3,5 5,4, 9,6 y 14,6 por ciento, de azúcar invertida respectivamente.

Medios 5, 6, 7 y 8 con 1,5 grs/litro de sulfato amónico frente a 3,5, 5,4, 9,6 y 14,6 grs por ciento de azúcar invertido respectivamente.

Medios 9, 10, 11 y 12 con 3,0 grs/litro de sulfato amónico frente a las mismas concentraciones de azúcar invertido citadas más arriba.

Medios 13, 14, 15 y 16 con 4 grs/litro de sulfato amónico frente a las concentraciones de azúcar invertido detalladas anteriormente.

Es decir, cada concentración de azúcar invertido se estudia en medios de cultivo con 0,5, 1,5, 3,0 y 4,0 grs/litro de sulfato amónico, repitiendo con ello los medios de cultivo estudiados en superficial y cultivo sumergido en matraces.

La temperatura se mantiene en 34°, el pH inicial es igual a 6 y el período de incubación en agitador-bandeja se reduce a cinco días.

Los resultados del presente ensayo pueden observarse en las Tablas XXVII y XXVIII que contienen los datos de medios de cultivo con 0,5 y 1,5 grs/litro de sulfato amónico, (Tabla XXVII) y con 3,0 y 4,0 grs/litro la Tabla XXVIII frente a las concentraciones de azúcar invertido que se citan al comienzo de esta serie experimental.

Comentario.— Hemos podido demostrar en esta serie experimental cómo la aireación influye de modo decisivo en cultivo sumergido. Aún con la concentración de 4,0 grs/litro de sulfato amónico, la inhibición sobre la producción de fumárico se consigue únicamente frente a la concentración de 3,5 grs por ciento de azúcar invertido.

Los mejores rendimientos se obtienen con las concentraciones de 0,5 y 1,5 grs/litro de sulfato amónico frente a 6 por ciento de azúcar invertido.

El equilibrio C/N depende por tanto de la aireación y es notable la semejanza de los valores de rendimientos que aparecen en la Tabla XXVIII con los de las Tablas XX y XXI de este mismo Capítulo referentes a cultivo superficial.

A lo largo de esta Tesis se ha adoptado como más conveniente para cultivo sumergido la concentración de 1,5 grs/li-

TABLA XXVII

Influencia de la concentración de 0,5 y 1,6 grs/litro de sulfato amónico en cultivo sumergido en nuevos recipientes, frente a distintas concentraciones de azúcar inicial. Adición de 4 % de polvo de mármol estéril, al tiempo de inocular. pH inicial-6. Temperatura 34 °C. Tiempo de incubación: cinco días.

SO ₄ (NH ₄) ₂ grs/litro	Azúcar invertido		Acido fundries grs/100	Rendimiento grs acido/100 grs azúcar consumido
	Inicial	grs/100 Consumido		
0,5	3,5	0,05	1,4	46
0,5	5,4	0,20	2,9	55
0,5	9,6	4,5	2,0	39
1,5	3,4	0	1,3	38
1,5	5,4	0,01	2,7	50
1,5	9,6	0,86	3,4	39
1,5	14,6	8,9	1,8	31

TABLA XXVIII

Influencia de la concentración de 3,0 y 4,0 grs/litro de sulfato amónico, en cultivo sumergido en nuevos recipientes, frente a distintas concentraciones de azúcar inicial. Temperatura: 34°C. Adición de 4% de polvo de mármol estéril al tiempo de inocular. pH inicial= 6. Tiempo total de incubación: cinco días.

SO ₄ (NH ₄) ₂ grs/litro	Azúcar invertido		Acido fumárico grs/100	Rendimiento grs ácido/100 grs azúcar consumido
	Inicial	Consumido		
3,0	3,5	0	0	0
3,0	5,4	0,01	1,9	35
3,0	9,6	0,08	2,7	28
3,0	14,6	6,5	2,6	32
4,0	3,5	0	0	0
4,0	5,4	0,1	1,3	24
4,0	9,6	0,1	2,5	26
4,0	14,6	7,9	2,1	30

tro de sulfato amónico con 6 por ciento de azúcar invertido en el medio.

4ª. serie experimental..- Influencia de la calidad de las sales nitrogenadas, en cultivo superficial.

Estudiamos en esta serie la influencia que tiene en el desarrollo del *Rhizopus oryzae* y en la producción de ácido fumárico en cultivo superficial, la utilización de sales nitrogenadas distintas del sulfato amónico empleado en las anteriores series, tales como nitrato amónico, nitrato potásico, nitrato sódico, carbonato amónico y urea.

Como agentes neutralizantes se utilizan mármol estéril en polvo (CO_3Ca cristalizado) y CO_3Ca amorfo, en cantidad del 5 por ciento.

Los resultados de esta serie se detallan en la Tabla XXI. Las condiciones de cultivo consisten en mantener la temperatura a 34°C durante los diez días de incubación y en que el medio básico habitualmente usado en esta Tesis y cuyas modificaciones se advierten en cada ensayo, tenga el pH inicial igual a 6.

Comentario..- En cultivo superficial es menos notable que en sumergido la influencia de los agentes neutralizantes. Esto se comprende fácilmente por las condiciones del primer tipo de cultivo que facilita el depósito del neutralizante en el fondo del matraz, mientras que en sumergido, debido a la -

agitación es constante el contacto con el medio.

Las sales amónicas son las más eficaces para la producción de ácido fumárico y de esta eficacia participa también la urea debido a sus grupos amínicos. El grupo nitrato, como aseguran muchos autores, no es utilizable (50) como fuente de nitrógeno por este género de mohos.

En nuestro caso no se consiguió desarrollo apreciable en los medios de cultivo con nitrato potásico y nitrato sódico.

5ª. serie experimental..- Influencia de la calidad de sales nitrogenadas en cultivo sumergido, en matraces.

Análogamente a la serie anterior se estudia ahora la influencia de distintas sales nitrogenadas añadidas al medio de cultivo en sustitución de sulfato amónico y en cantidades equivalentes. Estas sales son: nitrato y carbonato amónicos, urea, nitrato sódico y nitrato potásico.

Como agentes neutralizantes se utilizan en dos series simultáneas el carbonato cálcico amorfo o polvo de mármol (CO_3Ca cristalizado) a razón de 5 por ciento.

Las condiciones de temperatura, pH inicial, etc. son idénticas al anterior ensayo.

Los resultados se encuentran en la Tabla XXX.

Comentario..- Según los datos obtenidos, la influencia más decisiva en la producción de fumárico y desarrollo del Rh,

TABLA XXIX

Influencia del tipo de fuente nitrogenada sobre el desarrollo de *Rh. oryzae* y la producción de ácido fumárico, en cultivo superficial. pH inicial 6. Temperatura 32°C. Tiempo total de incubación: diez días. Adición, en cada caso, de 5% de CO_2 en amorpho o cristalizado (polvo de mármol) a los tres días de incubación.

Tipo de sal utilizada	Asúcar invertido		Materia seca	Ácido fumárico		Rendimiento
	Inicial	Consumido	grs/100	grs/100	grs ácido/100	grs azúcar cons.
Adición de 5 % de CO_2 Ca amorpho						
NO_3NH_4	10,0	7,5	0,50	3,1		41
$\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$	"	9,9	0,64	2,6		26
$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	"	10,0	0,92	3,1		31
NC_3K						
NO_3Na						
			sin desarrollo apreciable			
			sin desarrollo apreciable			
Adición de 5 % de polvo de mármol						
NO_3NH_4	10,0	7,4	0,48	3,2		43
$\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$	"	9,9	0,70	2,5		25
$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	"	10,0	0,86	3,2		32
NO_3K						
NO_3Na			sin desarrollo apreciable			
			sin desarrollo apreciable			

oryzae se debe a la sal fuente de nitrógeno empleada. En cultivo sumergido los neutralizantes, en estas condiciones, no aportan diferencias interesantes sobre los rendimientos. Las mejores fuentes de nitrógeno son el nitrato amónico y la urea. Tanto en nitrato sódico como el potásico no proporcionan el nitrógeno en condiciones asimilables por el microorganismo. El carbonato amónico que en superficial consigue un discreto rendimiento y algún desarrollo miceliar, no produce ácido fumárico a pesar de consumir abundante azúcar del medio. En este caso la alcalinidad del medio de cultivo será pues la responsable de esta falta de producción y confirma la hipótesis sobre el efecto de los neutralizantes que las observaciones recogidas en el Capítulo IV nos sugirieron, es decir, que mantener en los límites justos el pH a lo largo de todo el proceso de fermentación es la clave para la abundante producción de fumárico y el desarrollo del microorganismo.

TABLA XXX

Influencia del tipo de fuente nitrogenada sobre el desarrollo de Rh. oryzae y la producción de ácido fumárico, en cultivo sumergido en matraces. pH inicial 6. Temperatura 32°C. Tiempo total de incubación: diez días. Adición, en cada caso, de 5% de CO_3Ca amorfo o cristalizado (polvo de mármol) a los tres días de incubación.

Tipo de sal utilizada	Azúcar invertido		Materia seca grs/100	Acido fumárico grs/100	Rendimiento grs ácido/100 grs azúcar cons.
	Inicial	Consumido			
Adición de 5 % de CO ₃ Ca amorfo					
NO ₃ NH ₄	10,0	7,3	0,45	1,7	23
CO ₃ (NH ₄) ₂	"	9,7	0,32	0	0
CO(NH ₂) ₂	"	10,0	0,30	0,27	2
NO ₃ K			sin desarrollo apreciable		
NO ₃ Na			sin desarrollo apreciable		
Adición de 5% de polvo de mármol					
NO ₃ NH ₄	10,0	7,4	0,38	2,0	27
CO ₃ (NH ₄) ₂	"	9,7	0,60	0	0
CO(NH ₂) ₂	"	10,0	0,65	1,0	10
NO ₃ K			sin desarrollo apreciable		
NO ₃ Na			sin desarrollo apreciable		

CAPITULO V.

ESTUDIO DE LA AIREACION Y AGITACION DEL MEDIO DE CULTIVO.

Parte teórica.

Las ideas de aireación y agitación están íntimamente ligados porque no es posible airear debidamente todas las porciones de un medio de cultivo sin una adecuada agitación. En 1933 Kluyver y Perquin (38) comenzaron a utilizar para cultivo sumergido de mohos las técnicas del "Schutterkultur" que fueron más tarde adaptadas a la escala industrial por Herrick, Hellbach y May (33) mediante fermentadores rotatorios contruidos en aluminio, metal que se probó no era tóxico ni se atacaba por el ácido glucónico formado en su interior por la acción del *A. fumarius*. Estos principios descubiertos por Kluyver y Perquin en sus primeros ensayos con los "cultivos agitados" también fueron aplicados a la construcción de fermentadores en forma de depósitos verticales con un agitador mecánico y entrada del aire a presión a través del "sparger" que lo dispersa a través de todo el medio en forma de finas burbujas.

La agitación puede efectuarse de distintas maneras, todas procurando conseguir la máxima aireación:

a) sin agitación mecánica se puede airear el líquido y mantenerlo en movimiento para que no se forme un micelio superficial únicamente por la introducción de burbujas de aire

estéril.

b) Con agitación mecánica que puede consistir en el movimiento de un eje provisto de paletas en el seno del medio de cultivo, introduciendo a la vez aire a presión a través del spherger (éste es el método de agitación comúnmente usado en los grandes fermentadores industriales). La agitación de matraces u otros recipientes de laboratorio se hace por vaiven con lo que se consigue un desplazamiento alternativo de la masa micelial y el líquido de cultivo hacia una y otra de las paredes del recipiente, con formación de espuma y gran aireación, o bien colocando los matraces en bandejas rotatorias con un movimiento de excéntrica, que por la fuerza centrífuga comunicada, desliza el medio de cultivo en fina capa sobre las paredes del matraz y le expone por ello a un mayor contacto con el aire del interior de la vasija.

La revisión que publica anualmente Industrial and Engineering Chemistry en enero, recoge las variaciones a los métodos fundamentales que arriba reseñamos y que van produciéndose - conforme se aplica el cultivo sumergido a distintos tipos de fermentaciones industriales.

Y es que el estudio de la aireación y de sus efectos en el desarrollo y metabolismo de los microorganismos se ha hecho imprescindible para controlar eficazmente cualquier fermentación sobre todo en escala industrial y poder lograr los

mejores rendimientos en industrias tan importantes como la producción de antibióticos, vitaminas, ácidos orgánicos, etc.

Como ejemplos de la influencia que una buena aireación ejerce en los procesos metabólicos de algunos microorganismos citaremos:

En la producción de ácido glucónico en cultivo sumergido (95) se muestran los siguientes resultados: pasando 200 ml/minuto de aire estéril el rendimiento en ácido glucónico es del 49,8 % sobre la glucosa utilizada; pasando 800ml/minuto de aire estéril el rendimiento sube a 79,5 %. En este trabajo se comprobó sin embargo que valores superiores a los 1.200 ml/minuto de aire no acortaban el período de fermentación.

El efecto de la aireación sobre la producción de esporas por *Bacillus anthracis* y *Bacillus globigi* (66) se demostró en que corrientes de aire estéril del valor de 0,7 a 1,0 mM O₂/L/minuto, son suficientes para una completa esporulación de cultivos de 24 horas de edad iniciados previamente con esporas. Sin embargo los subcultivos iniciados en la fase de máximo - desarrollo vegetativo, cuando las esporas están a punto de aparecer, no precisan más que de 0,1 a 0,2 mM O₂/L/minuto, para conseguir una total esporulación.

En un reciente trabajo de Pig Shu (71) se estudia con un dispositivo ingenioso del autor que permite medir a lo largo de toda la fermentación el consumo de O₂, el efecto de

la aireación sobre la producción del ácido ustilágico por *Ustilago zeae*, de alfa-amilasa por *A. niger*, y de ácido cítrico por otra cepa de *A. niger*.

En la formación de ácido ustilágico y de alfa-amilasa el respectivo organismo utiliza eficientemente el O_2 a tensiones bajas y la producción de ácido fué paralela a la absorción de oxígeno. En la fermentación cítrica se observó también que la producción era paralela a la absorción de oxígeno pero que para una mejor utilización del oxígeno suministrado era precisa una mayor tensión que en los casos anteriores.

Finalmente (34) se ha comprobado que la media de la propagación de ciertas levaduras puede considerarse como la media de la absorción de oxígeno por el medio en que se cultivan, de tal modo que está ligada la propagación de estos microorganismos con el aporte de oxígeno al medio.

Sin embargo muchos de los efectos reseñados más arriba y otros muchos más que una interminable bibliografía nos muestra, no son comparables entre sí porque en dichos trabajos se acusan inexactitudes, imprecisiones frecuentes en la media de la aireación y en la expresión de las constantes empleadas para medirla. Además de que los valores de la aireación dependen fundamentalmente de los valores de disolución del oxígeno en el medio de cultivo, difusión del mismo, transporte a través del medio y su contacto con las enzimas embe-

bidas en el protoplasma acuoso que plantean muchos problemas químico-físico dada la complejidad de las fases presentes, micelio, medio de cultivo, paso a través del tapón de algodón. etc.

La medida de oxígeno absorbido por el medio de cultivo consiste en determinar alguno de los términos de la ecuación siguiente:

$$\text{Valor de absorción} = K_{La} (C^* - C_L)$$

siendo K_{La} el valor de la absorción en Mm/hora que depende de a unidad de área interfacial, C^* concentración en el equilibrio de oxígeno disuelto en Mm/litro y C_L concentración actual de oxígeno disuelto también expresada en Mm/litro.

Existen tres métodos para medir K_{La} , dos de ellos son polarográficos y son descritos por Wise (96) como "Métodos de muestras" y método de "Gassingout". En ambos se determina el valor de C_L mediante una célula polarográfica.

El tercer método usualmente empleado mide K_{La} indirectamente. Se trata de una oxidación de sulfito en una vasija de fermentación que se utilice en el trabajo normal. En presencia de sales de cobre o cobalto que actúan de catalizadores, la reacción con oxígeno o aire se lleva a cabo rápida e irreversiblemente en la fase líquida. Esto sirvió a Cooper Pernstrom y Miller (14) para usar este método para evaluar los contactos gas-líquido. Para hallar K_{La} se valora la so-

lución de sulfitos con yodo en intervalos durante la aireación. El valor de absorción hallado de esta manera es $K_L a C^*$ ya que C_L (Concentración de oxígeno disuelto) es cero en todas las muestras.

Sin embargo la absorción del aire por la solución de sulfito no es simple como parece. Hay también cierta confusión en la interpretación de los resultados obtenidos por este método y la complejidad del problema se demuestra en la revisión que hizo Abel (1) citando sobre el particular cerca de 100 referencias.

El método de sulfito modificado por Bartholomew, Karow, Sfat y Wiljelm (4) tiene la ventaja de no precisar instrumentos especiales, pero deben interpretarse con cautela sus resultados cuando se trata de caldos de cultivo de diferente densidad que la solución del sulfito, con células o hifas miceliarias en presencia, etc. que dan lugar a distintas fases y por tanto dificultan la solución del oxígeno en el medio y la hacen distinta de la disolución de dicho gas en una simple solución de sulfito.

En nuestro trabajo hemos adoptado para la medida de los valores de absorción de oxígeno, la fórmula que aparece en el trabajo de Auro, Hodge y Roth (3). Aplicando el método de Bartholomew y colaboradores y utilizando una máquina de agitación recíproca o de vaivén, obtienen en el papel semilogar-

rítmico unas rectas de las que deducen la ecuación siguiente:

$$\text{Log } A = \frac{(-1,657)V_L}{V_F - 0,94} + 7,9,10^{-5}V_L + 0,167$$

donde V_L significa el volumen de medio de cultivo o de solución 0,5 N de sulfito sódico, V_F es la capacidad total del ermenmeyer empleado en la determinación. Las diferencias en la determinación del valor de la absorción expresada en Mm/litro/minuto mediante la fórmula o por su lectura en la gráfica correspondiente son 5,75 %.

De esta manera solamente conociendo la capacidad total del ermenmeyer y el volumen del medio de cultivo ensayado puede predecirse el valor de la aireación en las condiciones experimentales de agitación que figuran en el citado trabajo (3).

En nuestros ensayos con ermenmeyer colocados en agitador-bandeja a 72 r.p.m. para la producción de ácido fumárico en cultivo sumergido, no conseguimos resultados comparables a los obtenidos en cultivo superficial. Suponiendo que las diferencias observadas eran debidas a una deficiente aireación en los matraces diseñamos unos recipientes cuya forma puede verse en la Fig. nº 1 de la parte experimental que transformaron el movimiento circular del medio en los matraces en un choque alternativo sobre las paredes.

Por tanto, la aireación obtenida por este tipo de agita

ción a través de un tapón especial era mucho mayor y esto se apreció notablemente en los rendimientos en ácido fumárico y en la mayor rapidez del proceso.

- - - - -

PARTE EXPERIMENTAL.

1ª. serie experimental.- Estudio de la relación S/V óptima en cultivo superficial.

El medio utilizado en las series experimentales que se agrupan en el presente Capítulo es el siguiente:

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,18	grs/litro
$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,06	id.
SO_4K_2	0,06	id.
$(\text{SO}_4)_2\text{FeNH}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,12	id.
$\text{SO}_4\text{Mn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,0035	id.
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	2,0	id.
sacarosa invertida neutralizada	10 a 12	grs/100 cc.

En las condiciones descritas para el cultivo superficial en Material, Métodos de Trabajo y Análisis de esta Tesis, se lleva a cabo el presente ensayo.

Empleamos matraces de vidrio Belgor de 100, 250 y 300 cc. de capacidad así como matraces Pyrex de 500 cc. A cada uno de ellos y para obtener la relación S/V más favorable se añaden distintos volúmenes de medio de cultivo como se aprecia en la Tabla XXXI.

El desarrollo del moho se efectúa en presencia de 5 grs. de polvo de mármol por cada 100 cc. de medio de cultivo.

Comentario.- La relación superficie/volumen influye en la producción de ácido fumárico de modo decisivo.

Cuando se desarrolla el micelio en cultivo superficial cubre una zona de mayor o menor extensión según sea la altura del medio de cultivo dentro del matraz y dependiente de la forma de éste.

En este ensayo los matraces de tipo Erlenmeyer, varían por tanto únicamente en capacidad total y sin embargo, la superficie libre donde se desarrolla y extiende el micelio varía considerablemente de unos matraces a otros y con el volumen del medio. Estas diferencias se reflejan en los resultados cuando se comparan volúmenes iguales de medio de cultivo contenidos en matraces de distinta capacidad aunque tengan igual forma.

Por ejemplo: 40 cc. de medio en matraces de 100 cc. de capacidad dan un rendimiento del 30 por ciento mientras que el mismo volumen en matraces de 250 cc. de capacidad logra un rendimiento del 34 por ciento.

75 cc. de medio de cultivo usado en esta Tesis, dan rendimientos del 23 y 37 por ciento respectivamente, según estén contenidos en matraces de 250 o 300 cc.

En general, observando los datos de la Tabla XXXI se comprueba que para el mismo tipo de matraz los resultados mejoran cuando disminuye el volumen del medio, porque existe mayor probabilidad de transformación del sustrato cuando mayor contacto tenga con la capa miceliar; ya que los productos asi

TABLA XXII

Estudio de la relación superficie/volumen más favorable a la producción de ácido fumárico por *Rh. oryzae*, en cultivo superficial. Temperatura 32°C. pH inicial 6. Adición de 5% de polvo de mármol estéril al inocular. Tiempo total de cultivo: diez días.

Capacidad del matraz en cc.	Medio de cultivo cc.	Ándicar invertido gms/100		Materia seca gms/100	Ácido fumárico gms/100	Rendimiento
		Inicial	Consumido			
100	25	12	11	0.9	4.4	40
100	40	"	11.4	0.8	3.5	30
250	40	"	11.5	0.7	4.0	34
250	75	"	11.5	0.9	3.0	28
300	50	4	11.9	0.7	4.2	35
300	75	"	11.5	0.8	4.3	37
500	75	"	11.6	1.0	3.8	32
500	150	"	10.2	0.9	2.9	28

milables se difunden con mayor rapidez en un volumen menor y porque la capa miceliar es más extensa en una forma de Erlenmeyer determinada, si la altura del medio de cultivo coincide con el máximo ensanchamiento del fondo del matraz.

2ª. serie experimental.- Estudio de la aireación en relación al volumen de medio, en cultivo sumergido en matraces.

El medio de cultivo que se detalla al comienzo de este Capítulo se modifica reduciendo la concentración de sulfato amónico a 1,5 gra/litro. El resto de las sales se mantiene constante y la concentración inicial de sacarosa invertida es de 10 por ciento.

Se emplean matraces de vidrio Pyrex de 500 cc. de capacidad con 100 y 50 cc. de medio de cultivo, matraces de vidrio Pyrex de 1.000 cc. de capacidad con 200 y 100 cc. de medio de cultivo, matraces vidrio Pyrex de 2.000 cc. de capacidad con 200 y 100 cc. de medio de cultivo.

El cultivo sumergido se efectúa en agitador-bandeja. Tiempo de incubación seis días, pH inicial igual a 6, temperatura 34², adición al tiempo de inocular de 5 por ciento de polvo de mármol estéril (carbonato cálcico cristalizado).

Los resultados del presente ensayo se recogen en la Tabla XXXII.

Comentario.- Del mismo modo que en cultivo superficial, cuando

se comparan rendimientos de matraces de la misma capacidad conteniendo volúmenes diferentes de medio de cultivo, se comprueba que a menos volumen de medio corresponde mayor rendimiento. En efecto, con el volumen de 200 cc. en matraz de 2.000 cc. de capacidad, el rendimiento es del 19 por ciento y con el mismo volumen de medio pero contenido en matraz de 1.000 cc. de capacidad el rendimiento desciende a 10 por ciento.

El volumen de medio de cultivo de 100 cc. se distribuye en tres matraces de distinta capacidad, a saber: matraz de 2.000 cc., matraz de 1.000 cc. y finalmente matraz de 500 cc. pues bien, produce rendimientos de 20, 19 y 17 por ciento confirmando la observación hecha en cultivo superficial de que el rendimiento para el mismo volumen de medio ensayo esta en razón directa de la capacidad de matraz.

Las anteriores observaciones demuestran que la aireación que se consigue al agitar en un matraz amplio un pequeño volumen, es favorable la producción de fumárico y que cuando mayor sea el contacto del medio con el aire se filtra a través del tapón de algodón estéril, hay una transformación más eficaz del sustrato en el producto que nos interesa, ácido fumárico.

Para conocer el valor de la absorción del oxígeno en las condiciones de cultivo expresada más arriba, se aplicó

la fórmula de Auro, Hodge y Roth (3) obteniendo los valores detallados en la Tabla XXXII y que demuestran esta relación entre el volumen de medio y la total capacidad del matraz utilizado mm de O_2 absorbido por litro y minuto. Corresponde la mayor absorción (1,567 mm O_2 /litro/minuto) al matraz de 2.000 cc. de capacidad con 100 cc. de medio y la menor absorción calculada al matraz de 500 cc. de capacidad con 100 cc. de medio. Los rendimientos coinciden aproximadamente con estos valores y el resultado menor correspondiente al matraz de 500 cc. con 50 cc. de medio, debe atribuirse a la evaporación durante el proceso debido al exiguo volumen ensayado.

3ª. serie experimental..- Efecto de la forma del recipiente y del modo de aislarlo del aire exterior. Cultivo sumergido.

En la Pág. num. 1 de la Parte Experimental de esta Tesis se describe la nueva vasija empleada en este ensayo, que fue diseñada por nosotros con el fin de conseguir las condiciones de agitación y aireación que alcanzan los rendimientos de fermentadores de acero inoxidable.

Nuestras observaciones en cultivo sumergido no ha hecho suponer que la falta de rendimientos aceptables en cultivo sumergido en matraces, se debía principalmente, además de la composición del medio de cultivo, a la falta de abundante aireación, al tipo de desarrollo miceliar que se conseguía; generalmente en forma de una masa celular con malas caracte-

TABLA XXXII

Estudio de la aireación como dependiente del volumen de medio de cultivo y la capacidad del matraz utilizado, en cultivo sumergido. Temperatura 34°C. Tiempo de cultivo total: seis días. Adición de 5 % de polvo de mármol estéril al inocular.

Capacidad del matraz en cc.	Medio de cultivo cc.	mM O ₂ /litro minuto	Azúcar invertido		Acido furfúrico grs/100	Rendimiento
			Inicial	Consumido		
2.000	200	1,162	11	9	1,7	19
2.000	100	1,567	"	9,9	2,0	20
1.000	200	0,556	"	10,6	1,1	10
1.000	100	0,990	"	10,1	2,0	19
500	100	0,530	"	9,1	1,6	17
500	50	0,925	"	10,1	1,0	10

rísticas para un proceso de fermentación en sumergido.

Por tanto, en este ensayo utilizando los recipientes utilizamos el tipo de tapón que ha de aislarlos del polvo atmosférico y mantenerlos sin contaminación de otros micro-organismos aún recibiendo el ~~mínimo~~ ^{menor} aporte de aire.

En la Tabla XXXIII pueden comprobarse las observaciones relativas a los siguientes ejemplos:

A una de las nuevas vasijas se añaden 300 cc. de medio de cultivo habitual, se tapa con algodón y se esteriliza. A los cuatro días de desarrollo en presencia de 4 gra/100 cc. de polvo de mármol estéril, el rendimiento es del 4 por ciento, hay un intenso color alcohólico y el correspondiente análisis comprueba la existencia en el medio de 2,6 cc. de alcohol por ciento.

Con otra vasija que ~~se~~ ^{se} tapón con vasitos de vidrio pequeños especialmente adaptados a la boca del recipiente, los resultados fueron aún peores, porque dicha capa impedía más eficazmente que el algodón el paso de aire exterior. Se lograron solamente 0,2 gra/100 cc. de medio con rendimiento del 3 por ciento. El alcohol producido en estas condiciones fué 2,5 cc/100.

Como la agitación era bastante intensa al transformar el movimiento circular del medio en los matraces, en choque violento sobre cada pared del nuevo recipiente, fallaba la

TABLA XXXIII

Efecto del tipo de recipiente utilizado y de la forma de aislarlo del aire exterior, en cultivo sumergido. Temperatura 34°C. Adición de polvo de mármol estéril al inocular.

Clase de tapón	Alcohol etilico cc/100	Azúcar invertido grs/100		Acido tartárico grs/100	Remanente grs deido/100 grs azúcar consumido
		Inicial	Consumido		
Pergamino	2,6	10	7,4	0,33	4
Tapa especial	2,5	"	6,9	0,20	3
Vasos 30 cc.	trases	"	8,5	4,2	49

entrada de aire y por tanto probamos a tapar las vasijas con vasos de vidrio Belgor de 50 cc. que no ajustaban exactamente a la boca y oscilando ligeramente por la agitación contribuían al paso del aire, impidiendo la entrada al polvo atmosférico, ya que van rodeados y apoyados sobre algodón estéril.

En las condiciones descritas, es decir con este nuevo tapón, el rendimiento en cultivo sumergido que en ensayos efectuados en matraces, no había superado nunca el 20 y 25 por ciento de rendimiento en ácido fumárico sobre el azúcar consumido, se eleva por la mejor agitación y aireación conseguida en estas vasijas, hasta el 49 por ciento al cabo de seis días de desarrollo. Estando el micelio en forma de diminutas bolitas que favorecen la buena producción.

Comentario.— Los resultados de la Tabla XXXIII son bastante elocuentes por sí mismos y comprueban nuestra hipótesis de que la cepa de Rh. oryzae que empleamos, no posee un mecanismo de transformación de azúcar en ácido fumárico que actúe en condiciones anaerobias y que solamente en condiciones aerobias, se consigue un rendimiento aceptable.

Mientras se utilizan matraces Erlenmeyer tapados con algodón, la aireación es precaria y el oxígeno disponible en el interior del recipiente puede llegar a agotarse, entonces el consumo de azúcar que suele ser completo, se desvía por otros caminos metabólicos anaerobios (producción de

alcohol) sin obtener cantidades apreciables de ácido fumárico.

Los nuevos recipientes diseñados por nosotros (Fig.1), han resuelto el problema de conseguir en agitador-bandeja - rotatorio, una óptima agitación y aireación que logra rendimientos en ácido fumárico comparables al cultivo superficial con un tiempo de incubación mucho menor, con ésto la producción de fumárico en cultivo sumergido alcanza interés industrial.

4ª. serie experimental..- Estudio del volumen óptimo de medio de cultivo para cultivo sumergido en los nuevos recipientes.

La capacidad de dichos recipientes (véase Fig. 1) varía entre 1.700 y 1.800 cc. En este ensayo estudiamos el volumen de medio más conveniente para la óptima producción de ácido fumárico, que debe cultivarse en dichos recipientes.

Se ensayan los siguientes volúmenes de medio de cultivo: 150, 250, 300, 350, 400 y 500 cc. del medio de cultivo empleado en la segunda serie experimental del presente Capítulo.

Tiempo de cultivo seis días, a la temperatura de 34°. Se añaden al tiempo de inocular 5 grs. de polvo de mármol estéril por cada 100 cc. de medio. Los resultados de este ensayo se recogen en la Tabla XXXIV.

Comentario..- En la agitación de estos nuevos recipientes influye el volumen del medio que se agita contrariamente a lo que sucede en los matraces. En éstos el movimiento circular

que se imprime al medio hace más favorable la aireación cuanto más delgada es la capa que recorre el fondo del matraz. En los nuevos recipientes se lanza el medio contra los dos extremos produciéndose una fina capa de líquido que resbala por la superficie cóncava de dichos extremos y cae produciendo abundante espuma. Este choque se repite constantemente porque la longitud del recipiente está calculada de manera que el líquido golpee alternativamente sobre una y otra pared, haciendo que la aireación sea abundante. Conforme se aumenta el volumen de medio (de acuerdo con la capacidad del recipiente y como se observa en este ensayo) más fuerte es el choque, más espuma se produce y mejor es la aireación conseguida.

En la Tabla XXXIV se comprueban los detalles comentados. El rendimiento del 50 por ciento sobre azúcar consumido que se obtiene con el volumen de 400 cc. es uno de los mejores conseguidos en la fermentación sumergida de fumárico, pero no se continua utilizando porque llega casi al límite de la capacidad del recipiente.

El azúcar se consume totalmente en todos los casos y nos demuestra que cuando la aireación no es suficiente el microorganismo consume carbohidratos por vías metabólicas diferentes a cuando existe aireación abundante en que el consumo de azúcar se traduce en producción de ácido fumárico.

TABLA XXXIV

Estudio del volumen óptimo de medio de cultivo, utilizando nuevos recipientes de vidrio de capacidad W 1775 cc, tapados con vasos de 50 cc, en cultivo sumergido. Temperatura 34°. Tiempo total de incubación: seis días. Adición de 5 % de polvo de mármol estéril al inocular.

Medio de cultivo en cc.	Azúcar invertido		Materia seca	Acido fumárico	Rendimiento
	Inicial	Consumido	grs/100	grs/100	grs ácido/100 grs azúcar consumido
150	11	9	0,30	1,3	14
250	"	9,2	0,37	3,6	39
300	"	10,2	0,39	4,0	39
350	"	9,1	0,35	4,1	45
400	"	10,0	0,40	5,0	50
500	"	10,2	0,39	2,8	27

5ª. serie experimental..- Cultivo sumergido en nuevos recipientes. Estudio del tiempo de incubación más favorable.

Con el medio de cultivo empleado en la serie anterior, procurando acortar el tiempo de incubación para que este proceso de producción micológica de ácido fumárico tenga interés industrial.

En nuevos recipientes con 350 cc. de medio de cultivo a los que se añade cuando se inoculan 5 grs de polvo de marmol estéril por cada 100 cc. de medio, se toman muestras cada 24 horas.

Las condiciones de temperatura y pH inicial son respectivamente 34° y 6.

Los resultados se describen en la Tabla XXXV.

Comentario..- La primera muestra corresponde a las 48 horas de cultivo y se observa un consumo reducido de azúcar invertido.

A las 24 horas más tarde corresponde un intenso consumo de azúcar y una importante producción de fumárico. En el intervalo entre las dos primeras muestras comienza el metabolismo de sustrato hacia la formación de fumárico una vez constituido el micelio y por tanto su máxima capacidad enzimática. A las 72 horas de inoculación e incubación, el rendimiento es del 30 por ciento.

Los valores de ácido fumárico siguen aumentando pero a

TABLA XXXV

Estudio del tiempo de cultivo óptimo, utilizando nuevos recipientes de vidrio para cultivo sumergido, en agitador-bandeja. Temperatura 34°C. Adición de 5 % de polvo de mármol estéril al inocular.

Tiempo de cultivo en horas	Azúcar invertido		Materia seca grs/100	Acido fúndrico grs/100	Rendimiento grs ácido/100 grs azúcar consumido
	Inicial	Consumido grs/100			
48	9,9	2,6	---	0,6	23
72	"	6,5	0,40	2,0	30
100	"	7,9	0,38	3,0	38
124	"	8,5	0,40	3,1	36
148	"	8,9	0,46	4,0	45

ritmo más lento y alcanzan el rendimiento del 45 por ciento a los seis días de desarrollo.

En posteriores ensayos hemos conseguido reducir el tiempo de cultivo intensificando principalmente la aireación, mediante el empleo de fermentadores de acero inoxidable.

6ª. serie experimental..- Estudio de la fermentación fumárica en fermentadores de acero inoxidable, en escala industrial.

El medio de cultivo es el habitualmente empleado en este Capítulo a partir de la segunda serie experimental.

Se preparan las sales del medio que corresponden a doce litros y se esterilizan dentro del fermentador de treinta litros de capacidad, junto con la cantidad fijada de sacarosa invertida mediante paso de una corriente de vapor de agua procedente de un autoclave. La condensación del vapor de agua llega a completar el volumen de doce litros.

Al comenzar el proceso y antes de la inoculación se analiza el azúcar invertido y el contenido en sulfato amónico, previniendo la excesiva dilución.

Las muestras se toman a tiempos distintos y en la Fig. nº 6 se sigue la marcha del proceso tanto respecto a la producción de ácido fumárico como al consumo de azúcar y de sulfato amónico.

La temperatura se mantiene a 34º, la corriente de aire estéril pasa constantemente a razón de 0,25 litros de aire

por minuto y litro de medio.

Comentario.— La concentración inicial de azúcar invertido es de 11,5 grs/100 cc. A las 88 horas de desarrollo, cuando el microorganismo lleva 72 horas en presencia de polvo de mármol estéril (carbonato cálcico cristalizado) la concentración de ácido fumárico se eleva a 4,2 grs/100 cc. Como el azúcar no se ha agotado totalmente y existe en este momento de proceso todavía la cantidad de 2,2 grs/100 cc. el rendimiento se eleva a 45 por ciento del azúcar consumido. Este valor se alcanza con este ensayo en un tiempo mucho menor que en la serie precedente (88 horas frente a 148 horas)

Como se comprueba por estos datos la agitación más enérgica y con constante entrada de aire estéril, son las ventajas que presenta el fermentador de acero inoxidable frente al nuevo recipiente diseñado por nosotros (vease Fig. nº 1) que hacen posible acortar el tiempo de cultivo consiguiendo un rendimiento del 50 por ciento mediante una incubación de 126 horas.

En la Fig. nº 6 se advierte con claridad que existe un tiempo crítico en el cual se completa el consumo de sulfato amónico del medio y se acelera la producción de fumárico. Esto sucede entre las 40 y 70 horas de desarrollo, o sea a las 24 horas aproximadamente de añadir el carbonato cálcico. La presencia como neutralizante del polvo de mármol es decisiva

para que comience la producción de ácido y se utilice eficazmente en este sentido el azúcar invertido presente en el medio.

La Fig. nº 6 nos muestra también la inconveniencia de no prolongar el período de incubación porque además de restar interés industrial al proceso, no conduce a mejores resultados ya que, al agotarse completamente el sustrato hidrocarburo el moho continúa metabolizando los productos intermedios que como el fumárico, contienen alguna energía y los quemamos completando el proceso de degradación de la glucosa a anhídrido carbónico y agua.

En la misma Fig. nº 6 recogemos el ensayo en el fermentador de acero inoxidable de un medio en que la concentración de sulfato férrico se disminuye a 0,025 grs/litro y la de azúcar invertido tiene el valor de 6 por ciento. El polvo de mármol se adiciona al tiempo de inocular la proporción del 4 por ciento.

Todos los factores citados que se han modificado respecto al primer ensayo que hemos comentado, influyen en que la producción de ácido fumárico se acelere notablemente y se consiga en 60 horas un rendimiento del 58 por ciento sobre azúcar consumido.

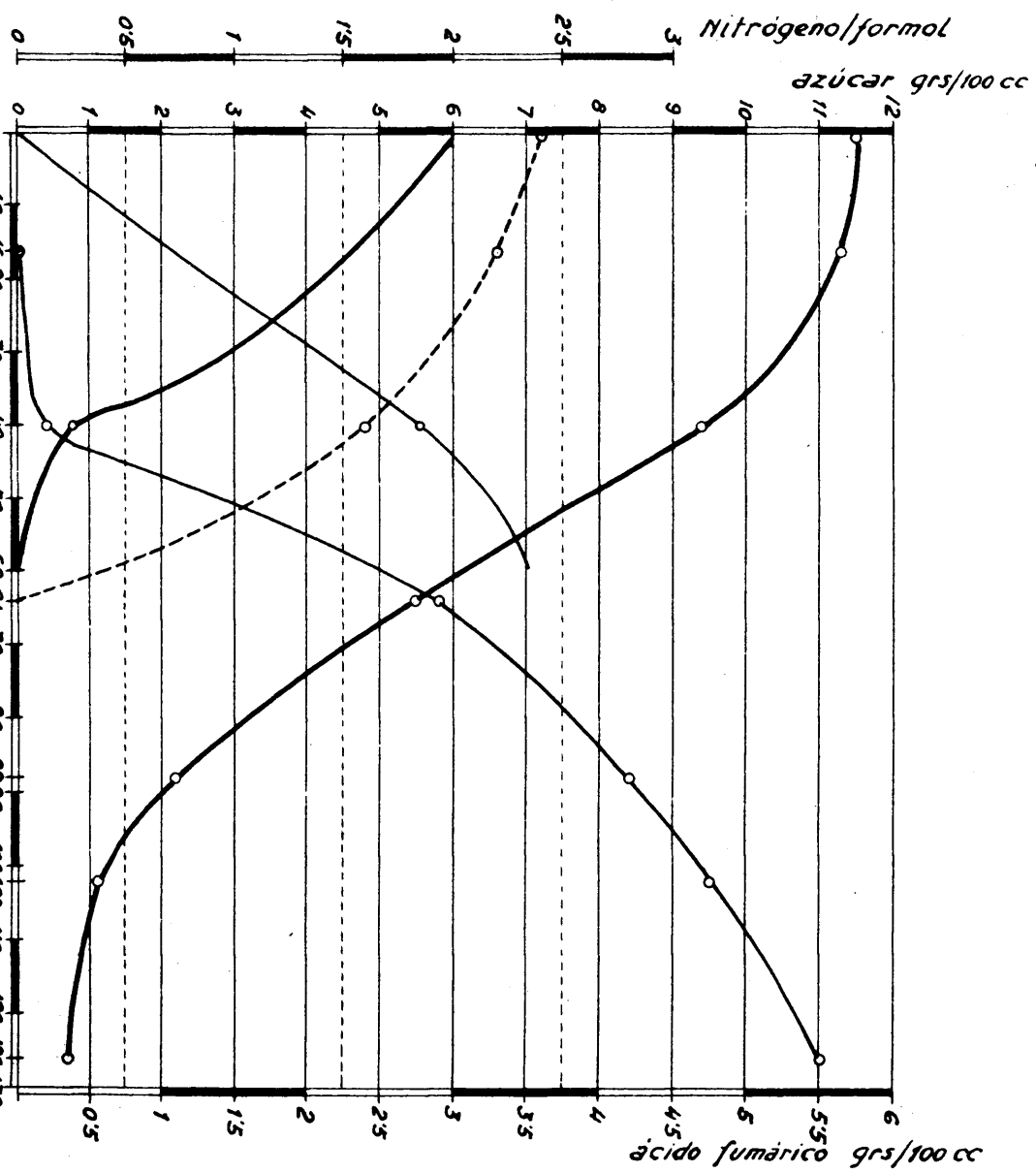


FIGURA Nº 6

CAPITULO VI.

TEORIAS DE FORMACION DEL ACIDO FUMARICO Y METABOLITOS IDENTIFICADOS MEDIANTE CROMATOGRFIA.

Parte teórica.

En las condiciones experimentales que se han detallado en los anteriores Capítulos, los rendimientos de ácido fumárico en cultivo sumergido, han alcanzado valores satisfactorios: sin embargo, un conocimiento más completo del proceso bioquímico de formación del ácido fumárico a partir de sustratos hidrocarbonados, fermentados por mohos, aportará datos y factores a tener en cuenta en la producción de dicho ácido.

Teniendo en cuenta que algunos autores, consideran los ácidos acético o cítrico, como paso intermedio en la formación de ácido fumárico por microorganismos, se han llevado a cabo algunas experiencias en las que estos compuestos han servido de sustrato a la acción de un micelio previamente desarrollado en un medio de cultivo normal. Los líquidos resultantes han sido estudiados mediante técnicas cromatográficas para identificar los ácidos formados en estas condiciones. Además, dichas técnicas se han aplicado también al análisis de los ácidos producidos en medios normales de cultivo en condiciones aeróbicas y anaeróbicas y en medios desequilibrados en cuanto a la concentración de nitrógeno,

con el fin de comprobar los caminos metabólicos seguidos por el microorganismo en la degradación de la glucosa a ácido fumárico.

Las técnicas de cultivo de reemplazamiento se han usado por Butkewistch y Fedoroff (11) para estudiar la transformación de acetato en ácido fumárico por su cepa de *Rhizopus nigricans*. Como sustrato se empleó también etanol, suponiéndole paso intermedio en la degradación de glucosa a ácido fumárico. La ecuación deducida de sus observaciones, para la formación de ácido fumárico a partir de glucosa es:



y de ella se deduce que el rendimiento no sobrepasará en ningún caso el 64,4 por ciento, del azúcar consumido.

También la escuela polaca de Chrzazosz (17) y la de Bernhauer (7, 8) estudiaron la síntesis de ácidos orgánicos a partir de acetato como única fuente de carbono. Suponían que en el metabolismo de *Aspergillus* y *Penicillium*, existían mecanismo de condensación de acetato para dar lugar a ácidos orgánicos, como succínico, fumárico, oxálico, málico y cítrico, partiendo de moléculas de glucosa que previamente se degradaban a acetato.

Nuestros ensayos sobre el citrato sódico, con micelios preformados de *Rh. cruzae* tienden a estudiar la posible intervención del ciclo de Krebs, en el proceso de formación de

ácido fumárico por mohos. Dicho ciclo cuenta al ácido fumárico entre sus eslabones y su acumulación en algunos cultivos supone carencia o débil actuación de la enzima fumarasa. Foster, Waksman y sus colaboradores (24) afirman que los altos rendimientos de ácido fumárico, obtenidos con su cepa *Rhizopus nigricans* n.º. 45, obligan a excluir el ciclo de Krebs de la formación de ácido fumárico a partir de etanol. Cuando las condiciones de cultivo son francamente aerobias suponen una condensación de fragmentos de dos carbonos (como acetato) ya que los rendimientos teóricos de moléculas tetracarbonadas a partir de estos fragmentos dicarbonados, por medio del ciclo de Krebs, alcanzarían solamente el 67 por ciento, mientras - que los obtenidos en sus ensayos llegan al 80 por ciento. Además aunque el ciclo tricarboxílico actuase con su máxima eficiencia produciendo ácidos dicarboxílicos tetracarbonados, los rendimientos nunca serían tan altos, ya que algunos de estos compuestos sufren inevitables desviaciones a aminoácidos etc.

Las condiciones de aireación del medio de cultivo son decisivas, admitiéndose para algunos Fungi la presencia de dos mecanismos para la síntesis de ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos:

- 1º. Condensación de dos fragmentos dicarbonados ($C_2 + C_2$)
- 2º. Fijación de un fragmento de un carbono sobre otro de tres carbonos ($C_3 + C_1$)

El primer caso se da en condiciones aerobias, preferentemente y se ha comprobado con etanol marcado por C^{14} (25), mientras que el segundo se da en condiciones anaerobias. Es posible que ambos funcionen en presencia de aire y hay que admitir que, cepas de *Mucorales* producen ácido fumárico aerobicamente y no anaerobicamente y que otras, las mejores productoras, poseen un mecanismo de fijación de CO_2 que suplementa el mecanismo más regular y frecuente de la condensación de fragmentos dicarbonados (26).

El ácido pirúvico producido al final de la degradación de la glucosa, por carboxilación dará oxalacético ($C_3 + C_1$) por descarboxilación acetaldehído y etanol, que se han encontrado en cultivos de *Rhizopus* y en nuestros ensayos en fermentador de acero inoxidable hemos comprobado la presencia de acetaldehído en los gases de salida, y finalmente la reducción del pirúvico previa a la carboxilación o descarboxilación, da lugar a ácido láctico también demostrado en nuestros cromatogramas. Todas estas hipótesis se han aducido sobre la formación de ácido fumárico por Foster y colaboradores (27).

De acuerdo con ciertas observaciones (9) y a pesar de haberse encontrado en plantas y microorganismos, las enzimas que participan en algunas fases del ciclo de Krebs, se cree que dicho ciclo no es el camino principal para la oxi-

dación de fragmentos dicarbonados (17). Incluso se ha afirmado que los ácidos α -cetoglutarico y oxalacético presentes en algunos cultivos, son debidos a la acción de enzimas más relacionadas con el metabolismo de aminoácidos y proteínas que con la oxidación de fragmentos dicarbonados. En nuestros cromatogramas, aparece reiteradamente la mancha identificada como ácido α -cetoglutarico, que puede interpretarse según las hipótesis citadas.

Recientes avances en el estudio de metabolismo intermedio de hidratos de carbono, han aclarado el proceso según el cual, sustancias de dos carbonos como etanol y acético, pueden dar lugar a materia celular en microorganismos capaces de utilizarlos como única fuente de carbono (40, 42, 43, 44, 45 y 67). Esto sucede en *Pseudomonas*, algunas cepas de *E. Coli* y ciertos mohos (60) donde parece darse una modificación o paso secundario del ciclo de Krebs, que produce un nuevo ciclo.

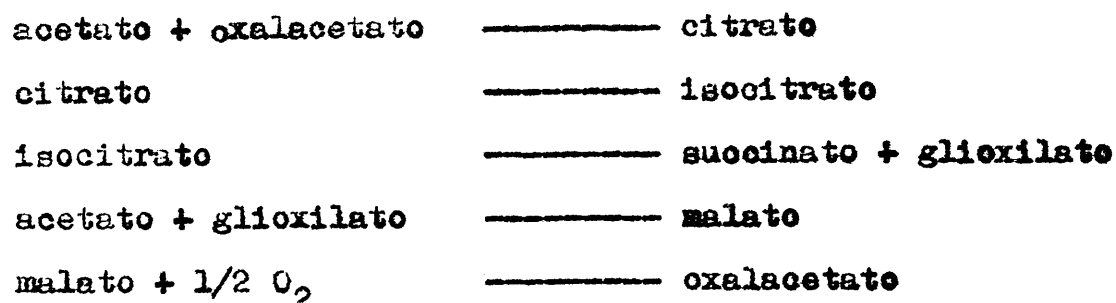
En experiencias con células de *Pseudomonas* KB, cultivadas sobre acetato amónico y ácido acético marcado con C^{14} como únicas fuentes de carbono, mediante análisis autoradiográficos (41), se mostró cómo las células oxidaban el acético a través del ciclo de Krebs, pero de la distribución de la radiactividad entre los compuestos marcados que proceden del acetato, así como de los cambios que sufren durante el

cultivo, puede deducirse que, el ácido acético entra en el ciclo por dos puntos, formando en un caso citrato y en el otro ácidos dicarboxílicos (58, 97). El primero que conduce a la formación de citrato consiste en la adición de acetato a oxalacético en presencia de CoA y ATP, y el segundo, según Kornberg es la adición de acético a glioxílico en presencia de CoA y ATP por acción de la malatosintetasa (97). La presencia de glioxílico que hace posible la anterior reacción se debe a una nueva enzima la isocitritasa que actúa sobre el ácido isocitrónico y que se encuentra en bacterias (74) algunos Fungi (60) y en levaduras, cuando las condiciones de cultivo son aerobias y se usan ácidos orgánicos como fuentes de carbono (75).

Admitiendo el ciclo glioxílico (glyoxylate bypass) existen dos posibilidades del ciclo tricarboxílico: una la oxidación del acetato a través de las conocidas reacciones del ciclo de Krebs, realizándose la oxidación completa de una molécula de acetato en cada vuelta del ciclo, la otra posibilidad consiste en sustituir las reacciones oxidativas (paso de isocitrato a malato) por el nuevo ciclo de glioxílico que sintetiza una molécula de succinato a partir de dos de acetato en cada vuelta del ciclo. En nuestros análisis cromatográficos, en condiciones próximas a la anaerobiosis (cromatograma nº 8) se advierten manchas con R_f semejante al de los isómeros del

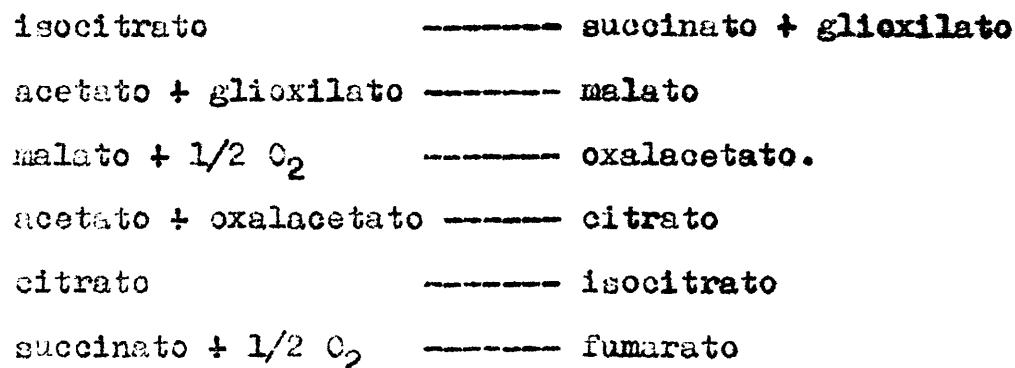
ácido glioxílico que se puso como patrón.

Con todo ello, la condensación de dos moléculas de acetato que carecía de comprobación experimental, vuelve a interesarse en recientes estudios y aunque la reacción total sea igual a la postulada por Thunberg y Kncop (87, 39), los pasos reales se interpretan así:



reacción total: 2 acetato + $1/2 O_2$ ——— succinato.

La formación de fumárico a partir de sustrato dicarbonados como etanol y acético, se interpreta según el nuevo ciclo (40) que comprende los resultados de Foster y colaboradores (24,25,26 y 27) resultando según las reacciones siguientes:



2 acetato + O₂ ——— fumarato.

La acumulación de ácido fumárico en cultivos de *Rhizopus* hace suponer escasa actividad de la enzima fumarasa. Los ácidos cítrico e isocítrico actúan como catalizadores en la producción micológica de ácido fumárico análogamente a lo que sucede en la producción de cítrico por mohos.

CAPITULO II

Parte experimental.

Cromatogramas de acidos libres en distintos ensayos en cultivo sumergido.

1ª. serie experimental.-- Cromatogramas de medios de cultivo con variaciones en la concentración de sulfato amónico y sus correspondientes reemplazamientos. Cultivo sumergido en matraces.

Damos a continuación en el Cuadro I la nomenclatura y composición de los medios que se analizan por el método cromatográfico de Lugg y Overell (51).

CUADRO I

Conc. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ Grs/litro	Conc. azúcar invertido en grs/100 cc.		
	6 Grs/100	8 Grs/100	10 Grs/100
0,5	medio 1	medio 2	medio 3
1,0	medio 6	medio 7	medio 8
2,0	medio 11	medio 12	medio 13

Estos medios que indican la composición en cuanto a la concentración de sulfato amónico y azúcar invertido, (el resto de las sales del medio se mantienen en las concentraciones acostumbradas, así como la adición al inocular al 5 por ciento el marmol, veanse series experimentales anteriores)

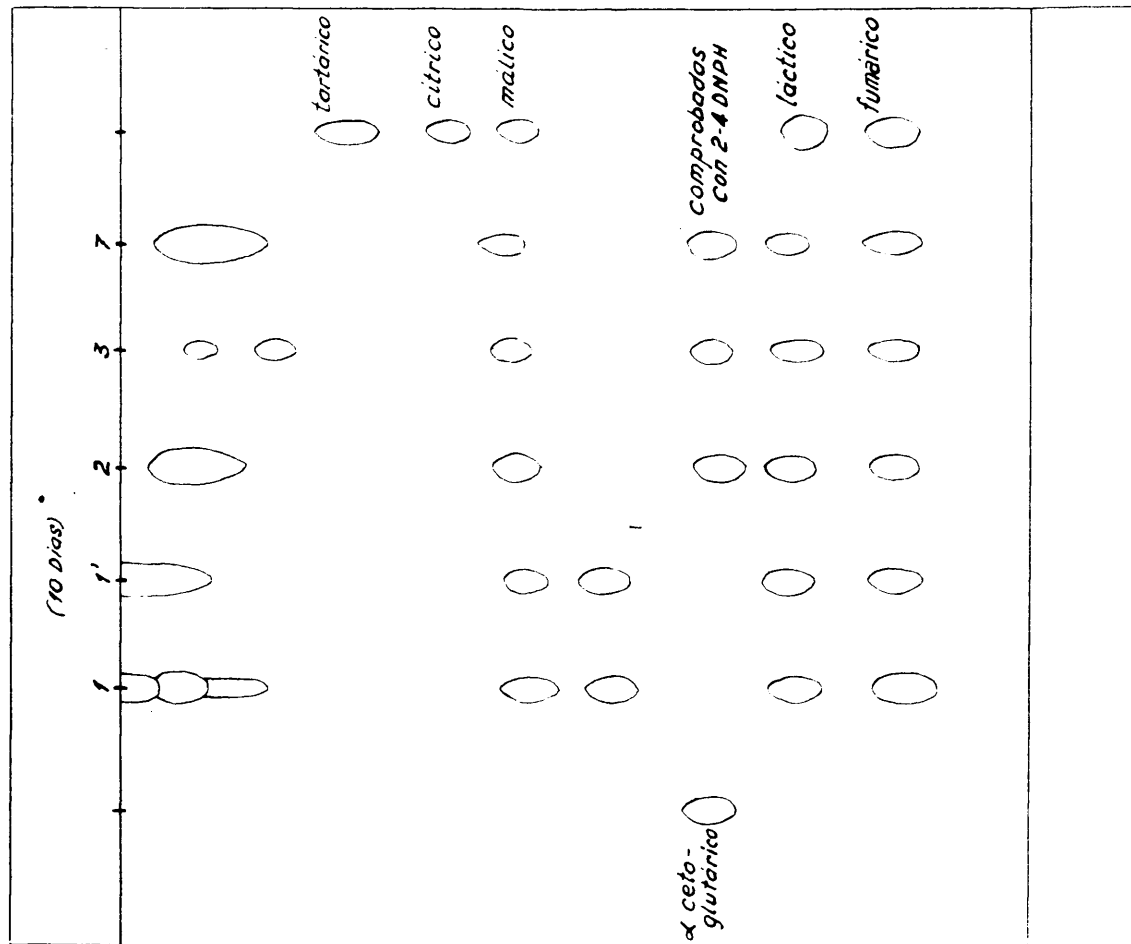
indican así mismo con una coma los correspondientes medios de reemplazamiento, cuya composición es únicamente de sacarosa invertida a la concentración del 6 por ciento que se adiciona acompañada de polvo de mármol estéril (5 por ciento) como agente neutralizante, después del que primitivo micelio desarrollado en el primer medio de cultivo, se ha lavado repetidas veces con agua estéril para librarle de los restos del anterior medio.

En los cromatogramas números 1,2 y 3 se resumen las manchas obtenidas en el análisis cromatográfico de los anteriores medios de cultivo. Las muestras correspondientes a los medios anteriores al reemplazamiento corresponden a 10 días de incubación y se anotan los tiempos de incubación correspondientes a las muestras de los medios de reemplazamiento (6 o 10 días).

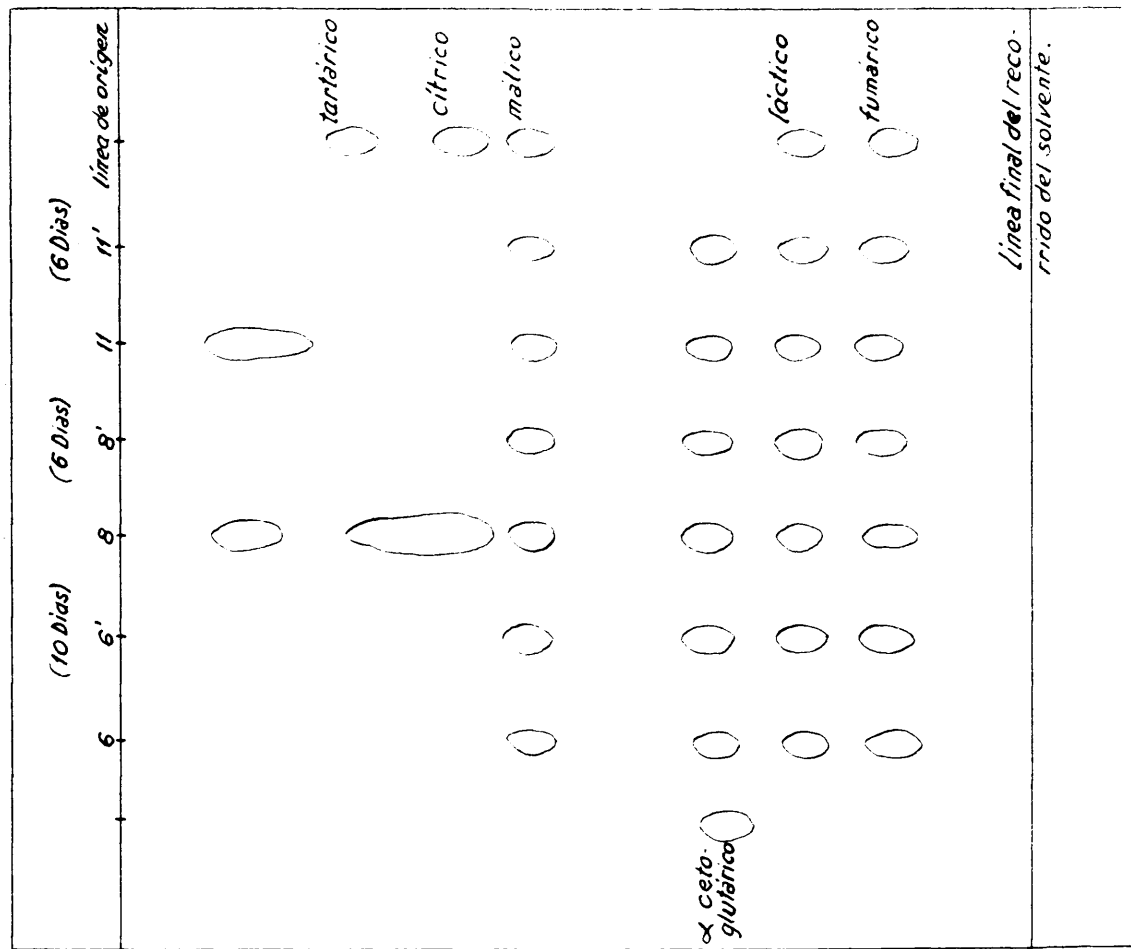
Comentario.— En la reproducción a escala reducida que se presenta en los citados cromatogramas números 1, 2 y 3, se observa que en los medios donde se efectuó el desarrollo del micelio antes de reemplazamiento, aparecen manchas de R_F inferior al ácido tartárico y cuyos R_F no pueden identificarse por el método empleado que tiene como valor menor R_F el correspondiente al tartárico ($R_F=0,21$).

Se supone que estas manchas de corto R_F que deben a ácidos fosfóricos porque no aparecen en los medios de reem-

CROMATOGRAMA n° 1.

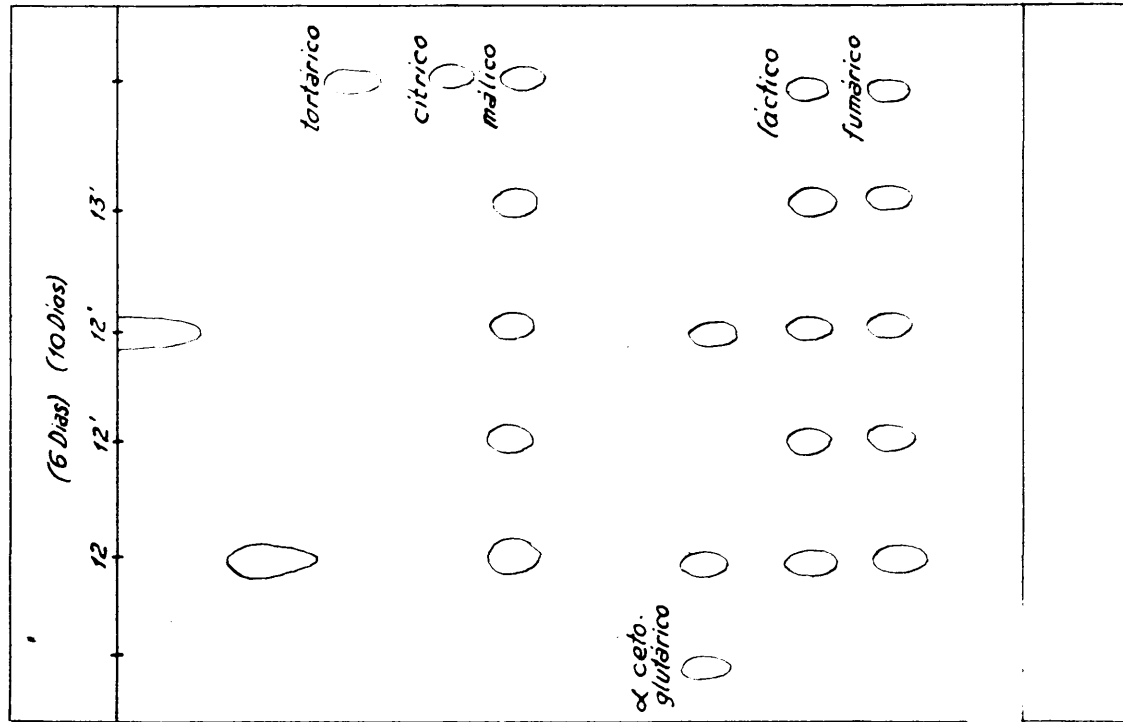


CROMATOGRAMA n° 2.

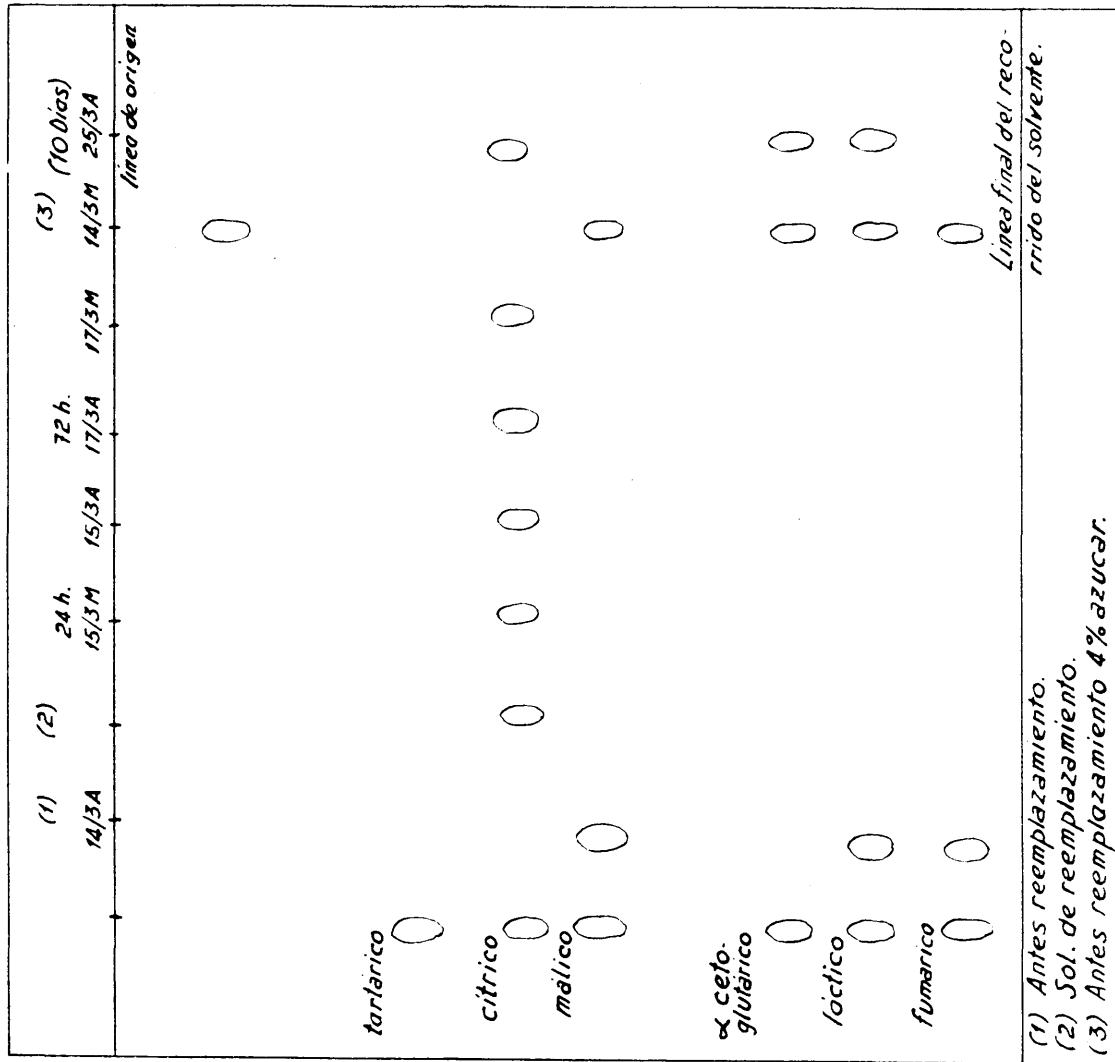


Cromatogramas descendentes butanol/fórmico 1:1

CROMATOGRAMA n° 3.



CROMATOGRAMA n° 4.



- (1) Antes de reemplazamiento.
- (2) Sol. de reemplazamiento 4% azúcar.
- (3) Antes de reemplazamiento 4% azúcar.

Cromatogramas descendentes butanol/formico 1:1

plazamiento. Hay una excepción en el medio 1'en que debido a la escasa concentración de sulfato amónico en el medio inicial (0,5 grs/litro) no se debió consumir adecuadamente el fosfato, lo que sucede con normalidad en los medios de cultivo durante la primera fase de crecimiento, en que agotan el fosfato. En el medio 8 aparecen todos los cromatogramas efectuados con una mancha muy intensa, de gran tamaño e irregular, que llega hasta la zona en que aparece el ácido cítrico sin que se logre reducirla y determinar su verdadero R_F . Las manchas del origen pueden ser restos de ácidos inorgánicos fuertes.

En todas las muestras se comprueban manchas a la altura en que aparecen los ácidos málico, láctico y fumárico. El ácido alfaacetoglutarico también en las muestras de medio de crecimiento y reemplazamiento excepto en los medios 1 y 1'.

2ª. serie experimental.-- Metabolismo del ácido cítrico por micelio preformado de *Rhizopus oryzae*.

El moho se cultivo sobre el medio habitual y en los - nuevos recipientes diseñados al efecto (véase Fig. nº 1). A las 48 horas de desarrollo se reemplazan los cultivos por un nuevo medio que consiste en 300 cc. de buffer de citrato sódico pH = 6. Las muestras que reproducimos en el cromatograma nº. 4 con la letra A corresponden a 24 y 72 horas des

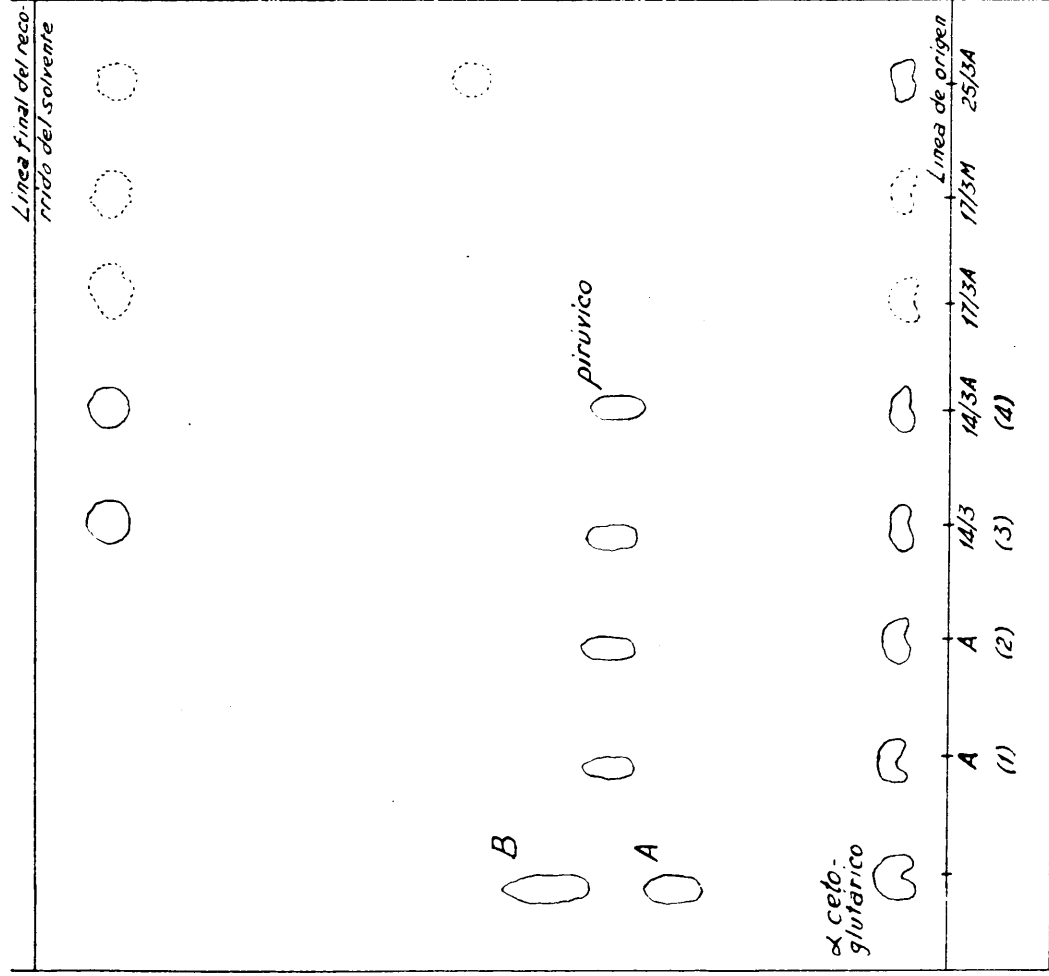
pués del reemplazamiento y a los 10 días del mismo. Simultáneamente se llevó a cabo este mismo ensayo en matraces erlenmeyer de 500 cc. de capacidad con 100 cc. de medio con el fin de comparar los resultados de ambas series. Las muestras correspondientes a esta última tomadas en los mismos periodos de incubación (24,72 horas y 10 días se distinguen con una M.

Los cromatogramas nº. 4, 5 y 6.

Comentario.- El medio de crecimiento que se analiza a las 48 horas de incubación, antes del reemplazamiento, produce tanto en matraces como en los nuevos recipientes las manchas atribuidas a málico, láctico y fumárico. En los matraces se advierten manchas de corto R_F y de alfacetoglutárico, que inexplicablemente no aparecen en los análisis correspondientes al medio incubado en los nuevos recipientes. Sin embargo con el método de Cavallini, previa precipitación de las 2-4-dinitrofenilhidrazonas, aparecen las manchas del alfacetoglutárico en dichas muestras.

Los cultivos de reemplazamiento con soluciones de citrato sódico no producen más que la mancha atribuida al cítrico en las muestras de 24 y 72 horas de incubación, tanto en matraces como en nuevos recipientes. A los 10 días persiste la mancha de cítrico y además se observan las de alfacetoglutárico y láctico. Esto puede deberse a un lento metabolismo del

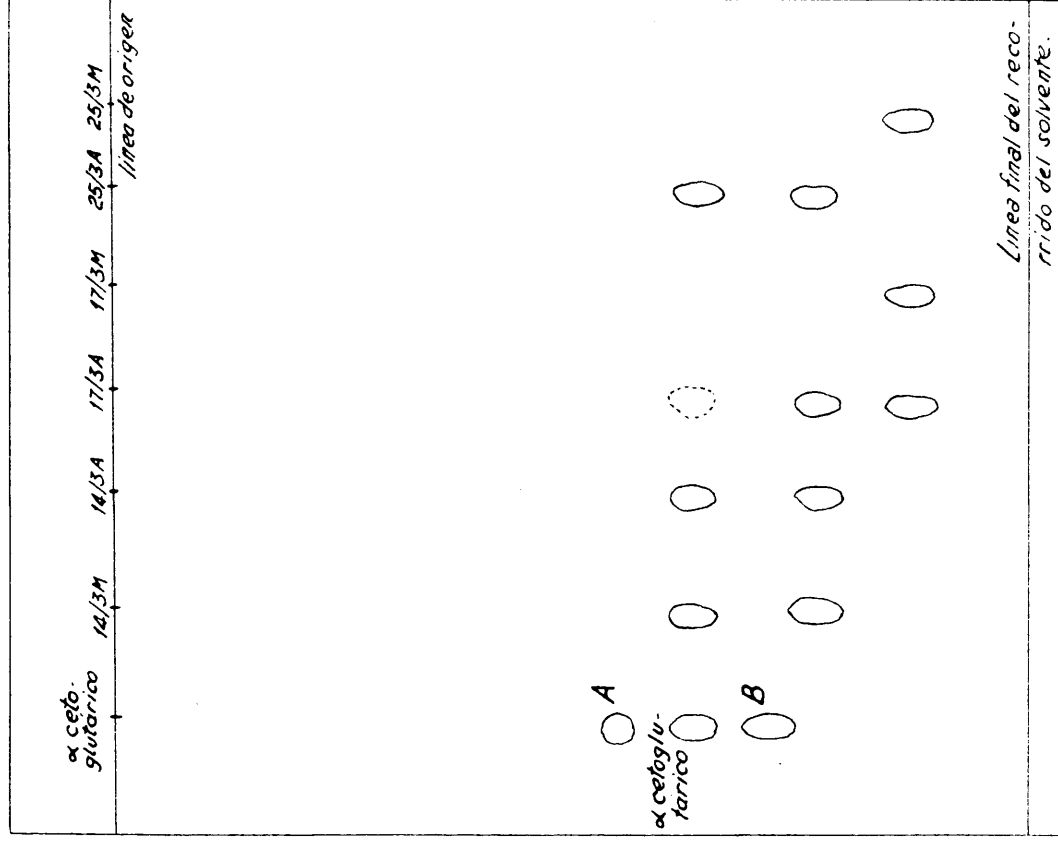
CROMATOGRAMA nº 5.



(1) Tapa propia.
 (2) Pergamino
 (3) Matrices antes reemplazamiento.
 (4) Antes reemplazamiento.

Ascendente 2-4 DNPH (El Hawary)

CROMATOGRAMA nº 6.



Descendente 2-4 DNPH (Cavallini)

A y B isómeros glioxilicos  vistas con luz ultravioleta.

cítrico que necesita más tiempo de incubación para degradarse, también que las células se autoliceen y los aminoácidos presentes (glutámico) den lugar a alfaacetoglutarico.

Los cetoácidos presentes se comprueban por el método de El Mawary (18) y por el de Cavallini y Frontali (12). Las manchas de alfaacetoglutarico aparecen por ambos métodos en las muestras del medio de desarrollo antes de reemplazar y en las correspondientes a los 10 días de reemplazamiento con citrato sódico. En muestras de 72 horas, las manchas de alfaacetoglutarico se perciben únicamente con luz ultravioleta y aparecen también manchas de R_F largo (0,94) que no se han identificado.

Los medios de cultivo iniciales contienen posiblemente ácido pirúvico (Vease cromatograma nº 5), pero no se comprobó su presencia por el método de Lugg y Overell por coincidir los R_F del láctico y el pirúvico.

3ª. serie experimental..- Metabolismo del acetato sódico por micelios preformados de *Rhizopus oryzae*.

En este ensayo se prepara una serie con nuevos recipientes tapados con vasos de 50 cc. estéril, en que durante dos días se desarrolla el moho en el medio habitual de cultivo con 4 por ciento de azúcar invertido y la adición al tiempo de inocular de 1 por ciento de polvo de mármol estéril.

A los 3 días se adiciona este medio de crecimiento con los siguientes:

Medio A₁, compuesto por 3 grs/litro de acetato sódico que se tampona a pH = 5 con ácido acético.

Medio A₂, contiene 6 grs/litro de acetato sódico tamponado a pH = 5 con acético.

Medio A₃, contiene 6 grs/litro de acetato sódico a pH = 7 sin tamponar.

En otra serie de recipientes en vez de añadir acetato sódico en las condiciones descritas, se reemplaza el primer medio de cultivo por:

Medio B₁, contiene 3 grs/litro de acetato sódico tamponado a pH ≠ 5 con ácido acético.

Medio B₂, contiene 6 grs/litro de acetato sódico tamponado a pH = 5 con acético.

Medio B₃, contiene 6 grs/litro de acetato sódico tamponado a pH = 5 con buffer de fosfatos.

Finalmente en una tercera serie se intenta desarrollar el *Rhizopus oryzae* directamente sobre acetato sódico como única fuente de carbono. Los medios de cultivo son los siguientes:

Medio C₁, con 3 grs/100 cc. de acetato sódico tamponado a pH = 6 con ácido acético.

Medio C₂, con 1,5 grs/100 cc. de acetato sódico tamponado

nado a pH = 5 con ácido acético.

Medio C₃, con 15 grs/100 cc. de acetato sódico tamponado a pH = 5 con ácido acético.

Medio C₄, con 3 grs/100 cc. de acetato sódico a pH = 7 sin tamponar.

El tiempo de cultivo varía en cada muestra. Las primeras se toman a los dos días de desarrollo en los medios detallados anteriormente. Hay muestras que corresponden a 4 y 5 días de desarrollo.

Los recipientes se colocan en agitador-bandeja ya descrito cuya temperatura se mantiene durante el proceso a - 34° C.

Los cromatogramas reproducidos por los números 7 y 9, muestran las manchas obtenidas en cada uno de estos medios bien como ácidos libres o en forma de 2-4-dinitrofenilhidrazonas.

Comentario.— En el cromatograma nº 7 se observa que los medios A₁, A₂ y A₃ en los que se efectuó una adición de acetato sódico tamponado al medio de cultivo inicial, muestran regularmente las manchas debidas al ácido alfaacetoglutarico y aparecen asimismo manchas de R_F largo no identificadas, en todas las muestras correspondientes a los dos, cuatro y cinco días de cultivo. Por tanto, no hay inhibición por parte del acetato sódico cuando se adiciona a estos medios

de cultivo bien desarrollados.

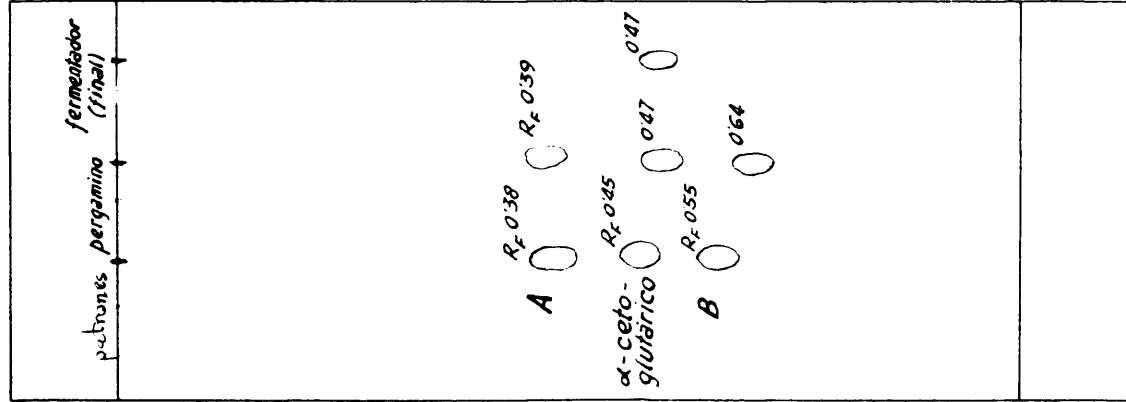
Del mismo modo el cromatograma nº 9 en que se analizan los ácidos libres por el método de Lugg y Overell, nos muestra las manchas correspondientes a los ácidos málico, láctico y fumárico, aunque no se aprecia la debida al alfaceto-glutárico debido sin duda a la poca concentración de la muestra aplicada al papel, como cabe deducir de su aparición en el método de las 2-4-dinitrofenilhidrazonas, en el que se precipita primero y luego se extrae con acetato de etilo.

Los medios C_1 , C_3 y C_4 no consiguen el desarrollo del moho y demuestran que el acetato sódico no sirve en estas condiciones como única fuente de carbono. No hubo consumo de acetato como se comprobó por el análisis de acético residual, mediante el método de determinación del mismo con arrastre de vapor y valoración del destilado con NaOH, ni aún después de adicionar a todos estos medios 1 por ciento de azúcar invertido con 1 por ciento de polvo de mármol estéril. Exceptuamos el medio C_2 en el que al principio tampoco se observó desarrollo más que ligeramente en torno a la boca del recipiente, pero que alcanzó normal desarrollo después de la adición citada de 1 por ciento de azúcar invertido y polvo de mármol. El análisis del acético residual demostró en este caso asimilación de acetato, por lo que puede suponerse que en estas condiciones el microorganismo es ca-

paz de incorporar a su metabolismo el acetato.

N O T A.- El cromatograma nº 8 corresponde a las condiciones experimentales detalladas en la 3ª. serie experimental del Capítulo V de esta Tesis. Puede observarse la aparición de manchas a la altura de R_F correspondiente a los dos isómeros del ácido glioxílico cuando el proceso es anaerobio y que sólo aparece el cetoácido, alfaetoglutárico, cuando el proceso llevado en el fermentador con abundante aireación es francamente aerobio (42, 43 y 44).

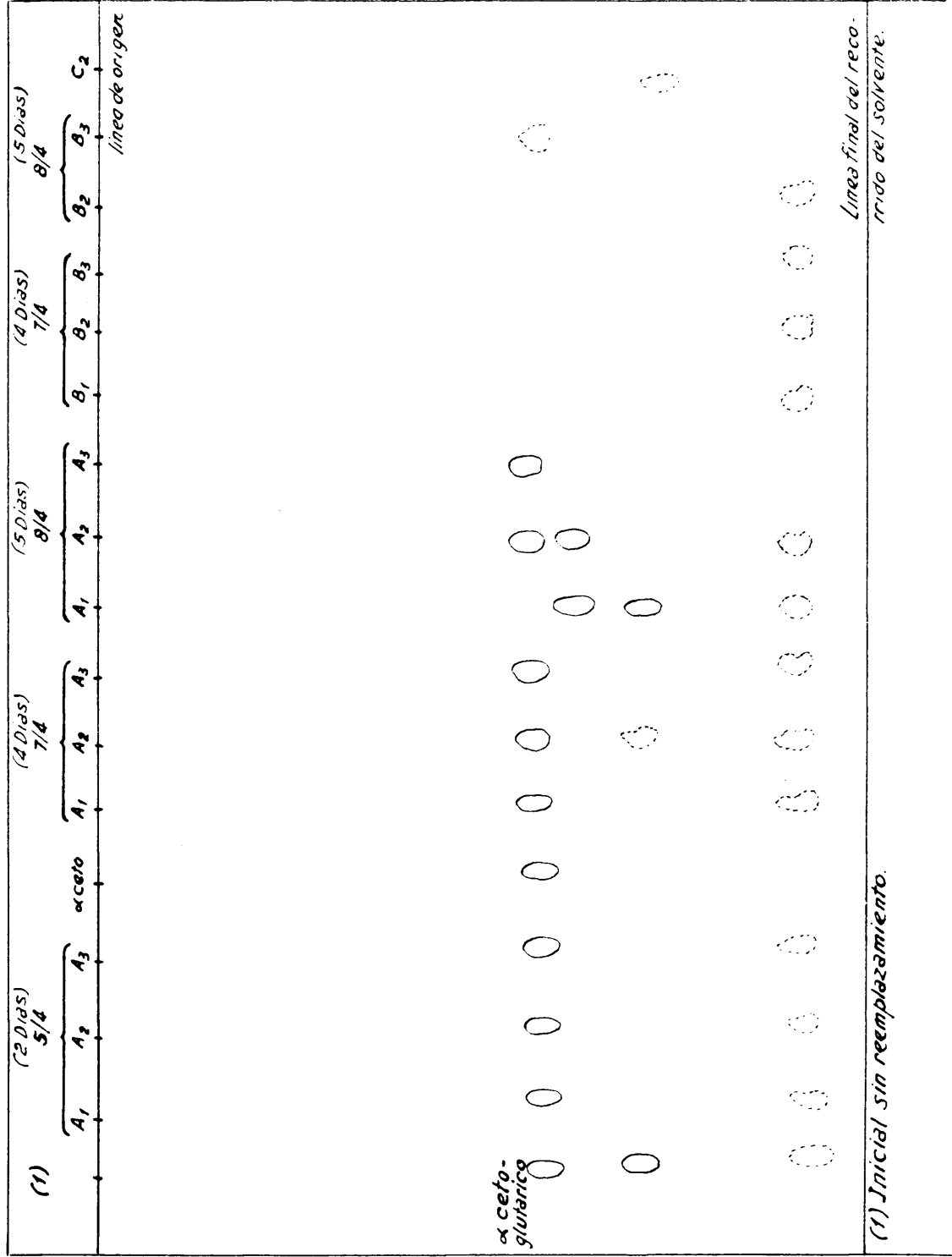
CROMATOGRAMA n° 8.



Cavallini (Descendente)

AyB isómeros glicólicos

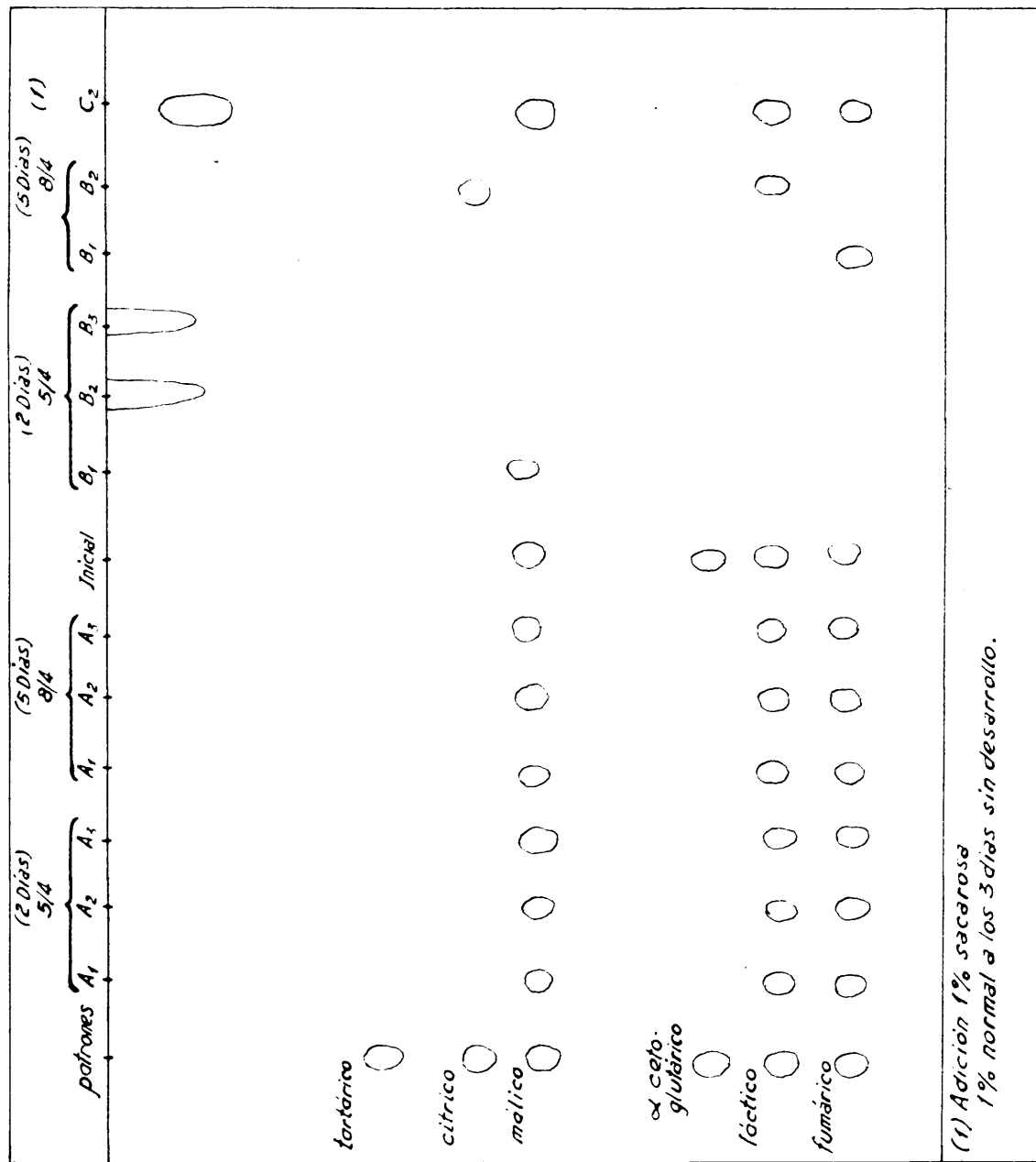
CROMATOGRAMA n° 7.



Cavallini (Descendente)

visitas con luz ultravioleta

CROMATOGRAMA n° 9



En los nuevos recipientes en los que se sustituyó el medio de crecimiento por los medios designados como B₁, B₂ y B₃ no pudo advertirse en ningún cromatograma efectuado por los métodos de Lugg y Overell ó Cavallini, manchas significativas. Unicamente en las muestras correspondientes a cinco días de incubación aparece en el medio B₁, ácido fumárico y en el medio B₂ ácidos cítrico y láctico. También en el cromatograma por el método de Cavallini se advierten manchas no identificadas de largo R_F que ya citamos al hablar de los medios A.

En estos medios de reemplazamiento donde existe un micelio preformado que puede retener residuos del medio inicial, que incluso posteriormente puede excretar compuestos endocelulares o sufrir una autólisis, las hipótesis ante la aparición de compuestos tales como el alfaetoglutarico, láctico, etc, son un tanto aventuradas y por eso nos limitamos a exponer hechos experimentales.

4ª. serie experimental..- Análisis cromatográficos de muestras sucesivas de un ensayo en el fermentador de acero inoxidable.

Este ensayo se refiere al descrito en la 6ª. serie experimental del Capítulo V de esta Tesis y las condiciones de cultivo pueden verse en dicha serie.

Las muestras se toman como se describe en los cromatogramas 7 y 8 a tiempos de incubación distintos y su análisis

cromatográfico cualitativo sobre papel se lleva a cabo por los métodos descritos en "Material y Métodos de trabajo en cultivo superficial y sumergido".

Las figuras nº 7 y 8 representan en abcisas los valores calculados del R_F de las manchas que aparecen en las muestras analizadas y en ordenadas las horas en que se tomaron dichas muestras. Asimismo se adjuntan los valores de R_F descritos en el trabajo de Wood y Bender (⁹⁸123) y que sirven de término de comparación para los hallados por nosotros.

Comentario.— Los cromatogramas efectuados por el método de Lugg y Overell (⁵¹62) para ácidos libres en papel Schleider-Schull 2043, descendente y los ascendentes en papel Whatmann nº 4 se representan en las figuras números 7 y 8.

Puede observarse que en las veinticuatro primeras horas de incubación aparecen manchas de corto R_F que según los valores que se adjuntan deben atribuirse a ésteres o ácidos fosfóricos. A las cuarenta y ocho horas de incubación comienzan a aparecer manchas más alejadas de la línea de origen y por tanto con un valor de R_F similar a los de los ácidos cítrico, alfaetoglutarico, láctico, etc. y que persisten durante todo el proceso de fermentación mientras siguen apareciendo manchas de mayor R_F (0,78 y 0,83) en el cromatograma ascendente que corresponden a ácidos succínico y fumárico. En las muestras finales obtenidas a las 144, 168 y 192 horas

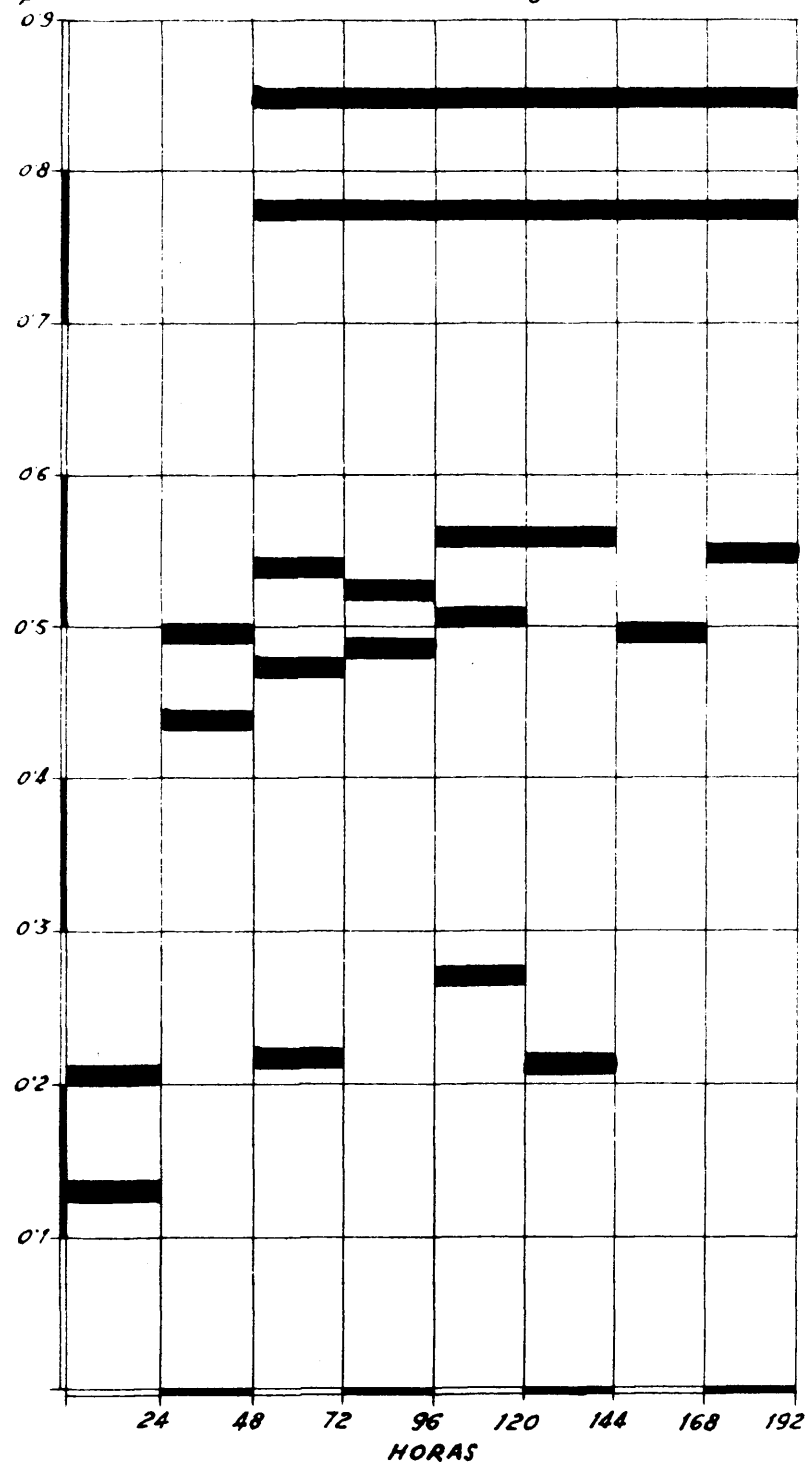
de cultivo en el fermentador de acero inoxidable, persisten las manchas atribuidas a ácidos fumárico, láctico, succínico, málico, cítrico y alfaacetoglutárico y han desaparecido por completo las atribuidas a ésteres o ácidos fosfóricos de corto R_F .

Estos resultados nos sugieren que el metabolismo de la glucosa por el microorganismo utilizado comienza en la fosforilación del hidrato de carbono por acción de los fosfatos inorgánicos y enzimas, y de ahí las manchas de corto R_F de las muestras primeras, conforme el moho adquiere la plena capacidad enzimática para continuar el metabolismo de la glucosa no se observan dichos compuestos fosfóricos y quedan visibles los ácidos orgánicos propios de este proceso fermentativo.

En el ensayo que nos ocupa se analizaron también cromatográficamente los gases que salían del fermentador arrastrados por la corriente de aire y que se recogieron en una solución de 2-4-dinitrofenilhidracina (1 gr. en el litro de clorhídrico 2N) produciendo abundante precipitado amarillo de 2-4-dinitrofenilhidrazona.

Por los métodos de Cavallini (12) El Hawary (18) y Sykora y Proshaska (82) se demostró la presencia de acetaldehído en dichos gases, comprobada por el dictamen del Laboratorio de Microanálisis del Instituto de Química Aplicada en que re-

R_F Fase móvil: butanol-acético-agua.-ASCENDENTE



Valores R_F
(Biochem. J. 67,370)
(1957)

- 0.15 glicerofosfórico
- 0.18 pirofosfórico
- 0.27 ortofosfórico
- 0.49 cítrico
- 0.55 α -cetoglutarico
- 0.54 maléico
- 0.55 málico
- 0.66 glioxílico
- 0.65 piruvico
- 0.78 láctico
- 0.78 oxalacético
- 0.83 fumárico

FIGURA nº 7

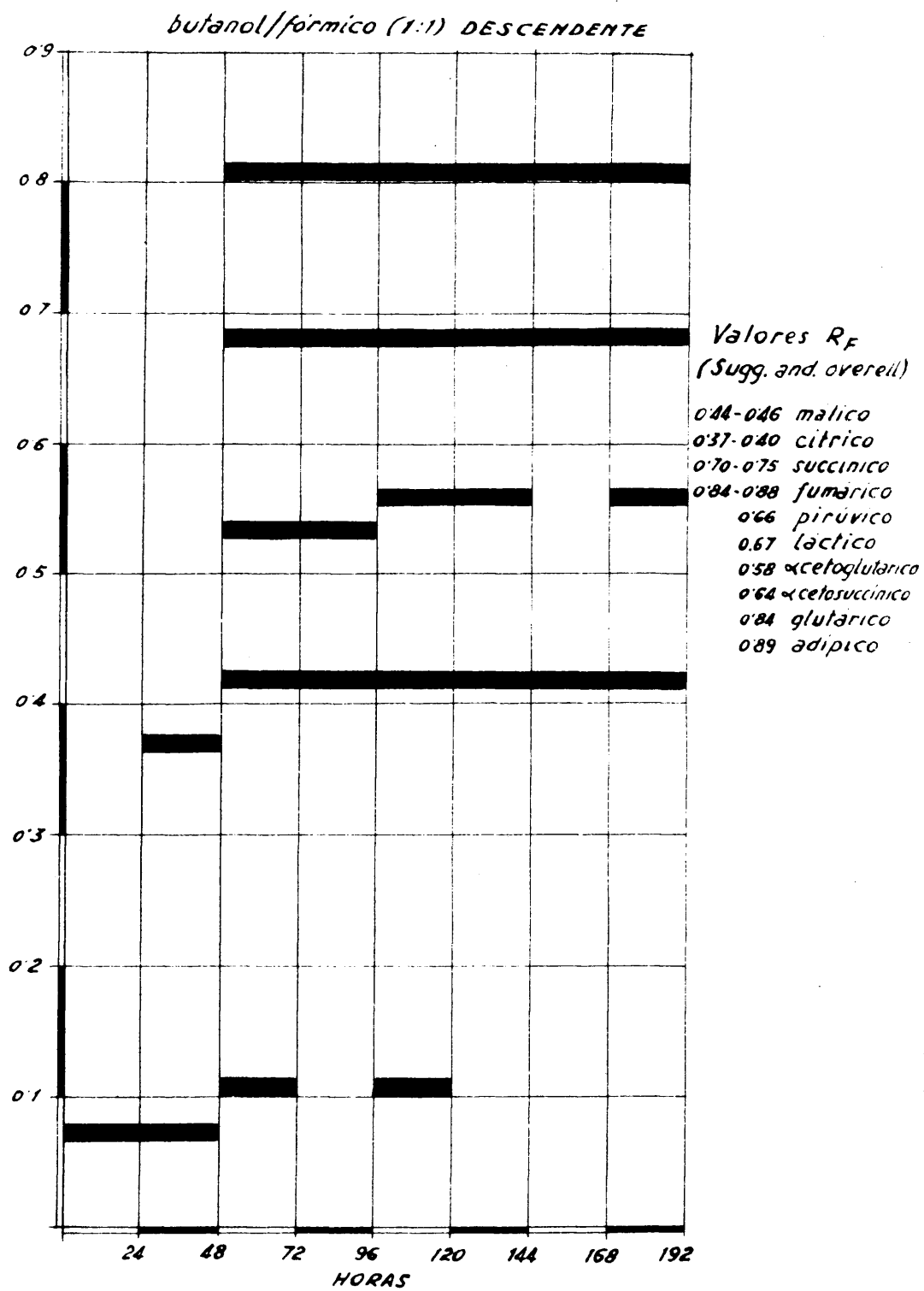


FIGURA 8

sulta un contenido en nitrógeno del 24,77 por ciento siendo 24,99 por ciento el que teóricamente corresponde a la 2-4-dinitrofenilhidrazona del acetaldehído. El punto de fusión de este compuesto es variable y depende de la forma cristalina; para la forma "estable" el punto de fusión es 168,5°C. existe una forma "metastable" que funde a 157°C, y finalmente en ciertas condiciones puede hallarse una mezcla en equilibrio de las dos formas citadas que funde a 148°C. Precisamente al determinar el punto de fusión de la 2-4-dinitrofenilhidrazona del compuesto arrastrado por los gases de salida del fermentador, observamos estas variaciones en los puntos de fusión obteniendo para el producto de la primera cristalización el punto de fusión a 156°C y en el de la segunda cristalización (ambas en alcohol de 96%) el punto de fusión es de 163°C.

CONCLUSIONES.

- 1.- Se ha estudiado la producción de ácido fumárico por *Rhizopus oryzae* Went y Prinsen Gerlinga (ensayado por Butflewitsch) tanto en cultivo superficial como en cultivo sumergido.
- 2.- En cultivo superficial, las concentraciones de cationes Fe y Zn favorables a la producción de ácido fumárico son respectivamente: 0,05 gra/litro de $(SO_4)_3Fe_2$ y 0,0035 gra/litro de $SO_4Zn.7H_2O$.
- 3.- En los ensayos en cultivo sumergido se aplica un nuevo recipiente, diseñado especialmente por nosotros para este tipo de cultivo, que produce rendimientos considerablemente elevados (65 por ciento sobre el azúcar consumido) y reduce notablemente el tiempo de incubación (a cuatro o cinco días).
- 4.- En cultivo sumergido utilizando dichos recipientes, bajan las impurezas de los reactivos de análisis que integran el medio de cultivo, para proporcionar las trazas de Fe y Zn suficientes para alcanzar el 50 por ciento de rendimiento, que se eleva al 65 por ciento si no se adiciona Fe y la concentración de $SO_4Zn.7H_2O$ es de 0,006 gra/litro.

5.- La relación O/P es decisiva para que un medio de cultivo produzca buenos rendimientos en un tiempo de incubación reducido. En nuestros ensayos en cultivo superficial, la concentración de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ de 0,18 gra/litro es la más conveniente cuando la concentración de azúcar invertido es de 110 gra/litro.

6.- La interdependencia de la concentración de fosfato y las de $(\text{SO}_4)_2\text{FeNH}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se ha manifestado en diversos ensayos tanto en cultivo superficial como sumergido. En superficial la producción de ácido fumárico es más favorable en el medio con 0,72 gra/litro de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ si la concentración de $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ es de 0,0035 gra/litro y no se adiciona sulfato férrico amónico. En cultivo sumergido aplicando los nuevos recipientes, las condiciones más favorables a la producción de fumárico se dan en el medio de cultivo con 0,72 gra/litro de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sin adición de sulfato de cinc y con 0,12 gra/litro de sulfato férrico amónico. Hemos observado que el consumo de azúcar es más completo en ausencia de Zn, ya que en los medios que lo contienen en cantidad superior a las impurezas, se aprecia menor consumo de azúcar. Para advertir esta influencia del Zn es preciso trabajar con concentraciones de fosfato monosódico inferiores a 0,18 gra/litro.

7.- La relación C/N tiene mucha importancia en el desarrollo de *Rhizopus oryzae* y en la producción de ácido fumárico, ya se trate de cultivo superficial o sumergido teniendo en cada caso distinto valor. En cultivo superficial la concentración de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ más conveniente está comprendida entre 1,0 y 3,0 gra/litro frente a la concentración de azúcar invertido de 8 a 10 por ciento. En cultivo sumergido en matraces Erlenmeyer, los rendimientos oscilan entre 30 y 34 por ciento cuando la concentración de sulfato amónico está comprendida entre 0,5 y 1,0 gra/litro y la de azúcar invertido es de 10 a 12 por ciento. Es notable la inhibición ejercida sobre la producción de ácido fumárico por concentraciones de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ superiores a 1,0 gra/litro que se advierten incluso cuando la concentración de azúcar invertido es del 12 por ciento.

8.- En cultivo sumergido en los nuevos recipientes, no se observa inhibición por altas concentraciones de sulfato amónico, únicamente se da dicha inhibición cuando la concentración de azúcar invertido es de 3,5 por ciento y la de sulfato amónico es de 4,0 gra/litro. La aireación tiene en este caso una influencia decisiva como puede comprobarse al comparar resultados obtenidos en cultivo sumergido en matraces con los de nuevos recipientes. Los rendimientos alcanzan en

éstos el 50 por ciento sobre azúcar consumida en cinco días de incubación, cuando la concentración de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ es de 1,5 gra/litro y la de azúcar invertido de 5,4 gra/100 cc.

9.- En cultivo superficial las sales amónicas y la urea proporcionan el nitrógeno adecuado para la formación de materia celular. Los nitratos sódico y potásico no suministran nitrógeno en forma asimilable por el *Rhizopus oryzae*, como ha sido también comprobado por otros autores. En cultivo sumergido resultan ser las mejores fuentes de nitrógeno el sulfato y nitrato amónico así como la urea. El grupo nitrato no es asimilable y comprobamos que los grupos amónicos y amínicos son los utilizados por el microorganismo.

10.- Es imprescindible la presencia de un neutralizante para efectuar en condiciones favorables el proceso de la fermentación con *Rhizopus oryzae*. En medios de cultivos óptimos a la que no se adicionó ningún neutralizante, no se produjo fúngico ni un normal crecimiento del moho; esto demuestra que el valor del pH ha de mantenerse entre límites adecuados (5 y 6) a lo largo de todo el proceso de fermentación.

11.- La calidad y la cantidad del neutralizante son extremos de importancia en esta fermentación. En cuanto a la calidad ha de comprobarse la aportación de cationes pesados (Fe, Zn,

Ca, etc) en las impurezas de dicho neutralizante. Cantidades superiores a los 2 gra/100 de CO_3Ca en polvo, inhibían la producción de fumárico en cultivo sumergido en matraces erlenmeyer. En cultivo superficial, cantidades superiores (hasta del 12 por ciento) no afectan de manera notable ni el desarrollo ni el consumo de azúcar invertido, aunque el rendimiento de ácido fumárico disminuye conforme aumenta la cantidad de carbonato cálcico añadida.

12.- La aplicación como neutralizante del polvo de mármol (CO_3Ca cristalizado) tiene evidentes ventajas sobre otros tipos de neutralizantes empleados por diversos autores. La menor reactividad y la relativa pureza química de dicho producto la caracterizan como adecuado neutralizante para el presente proceso de fermentación. Además se trata de un producto de bajo coste y fácil manipulación especialmente apto para usos industriales.

13.- La urea utilizada como fuente de nitrógeno compensa durante algún tiempo de incubación la falta de neutralizante, pero la producción de fumárico se detiene cuando la urea se consume por el microorganismo y disminuye el valor de pH a zonas ácidas.

14.- La relación S/V más favorable a la producción de fumá-

rice en cultivo superficial, resulta cuando en matraces erlenmeyer de 100 cc. de capacidad se añaden 25 cc. de medio de cultivo óptimo. En matraces erlenmeyer empleados en cultivo sumergido, el volumen óptimo de medio de cultivo es de 100 cc. contenidos en matraz de 2.000 cc de capacidad.

15.- Empleando nuevos recipientes el volumen óptimo para conseguir la mejor agitación y con ella la aireación más conveniente, es de 400 cc. El tiempo de incubación más adecuado es de 148 horas que no debe prolongarse para evitar que, habiendo agotado el azúcar disponible del medio, el microorganismo consuma el ácido fumárico ya formado.

16.- En fermentador de acero inoxidable de 30 litros de capacidad, se han alcanzado rendimientos del 50 por ciento en 126 horas de cultivo, si la concentración de azúcar invertido inicialmente es del 11,5 por ciento. Este tiempo de incubación se reduce considerablemente, a 60 horas, aumentando el rendimiento hasta el 58 por ciento, si la concentración inicial de azúcar invertido es de 6 por ciento, con 0,025 gra/litro de $(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$ y 1,5 gra/litro de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

17.- En los análisis cromatográficos de diversos medios de cultivo sumergido, se ha comprobado la presencia de los ácidos α -cetoglutarico, pirúvico, málico, láctico y fumárico. Los

micelios preformados de *Rh. cryzae* no metabolizan en las condiciones indicadas ni el citrato ni el acetato sódico. Las manchas de ácido α -cetoglutarico y ácido láctico que se observan en los medios de reemplazamiento sobre citrato sódico pueden también ser resultado de autólisis de las células del moho.

18.- No se consigue desarrollar el moho sobre acetato sódico como única fuente de carbono, en cultivo sumergido, parte del acetato se asimila en presencia de 1 por ciento de azúcar invertido cuando la concentración de acetato es de 1,5 gra/litro, en medios tamponados a pH 5 con acético.

19.- En muestras sucesivas, obtenidas del fermentador de acero inoxidable a tiempos distintos de incubación, se observan manchas atribuidas a ésteres ó ácidos fosfóricos en las correspondientes a las primeras horas de cultivo, que desaparecen cuando comienzan a aparecer las debidas a los ácidos cítrico, α -cetoglutarico, málico, succínico, láctico y fumárico. En los gases de salida de dicho fermentador, recogidos sobre 2-4-dinitrofenilhidrazina, se ha podido comprobar la presencia de acetaldehído. Estos datos demuestran la concurrencia de varios procesos metabólicos en la producción de ácido fumárico por fermentación y, teniendo

en cuenta las diversas teorías de formación de dicho ácido, creemos que será de interés continuar el estudio del porcentaje en que cada uno de los diversos mecanismos contribuye al rendimiento total del ácido fumárico producido por *Rhizopus oryzae* Went y Prinsen Geerlings (ensayado por Butkevitch).

== oOo ==

BIBLIOGRAFIA

- (1) Abel, E., Monatsch. Chem. 82, 815-834 (1951)
- (2) Akashi, S., J. Biochem. Japan 29, 21-29 (1959)
- (3) Aure M.A., Hodge H.M., Roth W.G., Ind. Eng. Chem. 49, 1237-1238 (1957)
- (4) Bartholomew W.H., Karrow B.O., Staf M.R. and Wilhelm R.H. Ind. Eng. Chem. 42, 1801-1815 (1950)
- (5) Bernhauer K., Thole H., Biochem. Z. 287, 167-171 (1936)
- (6) Bernhauer K., Miksch J., Rauch J., Nielke-Miksch R. Biochem. Z. 320, 390-397 (1950)
- (7) Bernhauer K., Thelen, Biochem. Z. 253, 30-36 (1932)
- (8) Bernhauer K., Siebenanger H., Biochem. Z., 240, 232-244 (1931)
- (9) Bortels, H., Biochem. Z. 182, 301-358 (1927)
- (10) Butkewitsch W., Fedoreff H., Biochem. Z. 206, 440-456 (1929)
- (11) Butkewitsch W., Fedoreff H., Biochem. Z. 219, 103-121 (1930)
- (12) Cavillini D., Frontali N., Biochem. and Biophys. Acta, 13, 439 (1954)
- (13) Clutterbuck P.W., Mukkepadhyay S.L., Oxford A.E. y Raistrick H. Biochem. J. 34, 664-677 (1940)
- (14) Cooper C.M., Fernstrom G.A., y Miller S.A., Ind. Eng. Chem. 36, 504-509 (1944)
- (15) Compin, M.H., Compt. rend. 157, 1475 (1913)
- (16) Cheftel R.I., Munier R., Mahebecuf H., Bull. Soc. Chim. Biol. Paris, 34, 380 (1952)
- (17) Chrasness y Tiukow, Biochem. Z. 229, 343-357 (1930)
- (18) El Hawary M.F.S. y Thompson R.H.S., Biochem J. 53, 340 (1953)
- (19) Erlich, F. Ber. 44, 3737-3742 (1911)
- (20) Erlich, F., Biochem. Z. 36, 477 (1911)
- (21) Foster J.W. "Industrial Fermentations" Underkofler and Hickey, Chem. Publis. Co. (1954)

- (22) Foster, J.W., Waksman S.A., J.Am.Chem.Soc. 127-135 (1939)
- (23) Foster, J.W., Waksman S.A., J.Bact. 57, 599-617 (1939)
- (24) Foster, J.W., Carson S.F., Anthony D.S., Davis J.B.,
Jefferson W.E. y Long H.V., Proc.Nat.Acad.Sc. 35, 663 (1949)
- (25) Foster, J.W. y Carson S.F., Proc.Nat.Acad.Sc. Proc.Nat.Acad.
Sc. 36, 219-229 (1950)
- (26) Foster, J.W. y Davis J.B., J.Bact. 56, 329-338 (1948)
- (27) Foster, J.W., Carson S.F., Ruben S. Y Kamen H.D.,
Proc.Nat.Acad.Sc. 27, 590 (1941)
- (28) Gale, E.F. "Chemical Activ. of Bact." Univ. Tut. Press, London
(1950)
- (29) Garrido, J.M., Anal.R.Soc.Esp.Fis.Quim., serie B, XLIX,
829 (1953)
- (30) Garrido, J.M., Thesis Phyl. Victoria Univ. Manchester (1954)
- (31) Gayet, Tesis Doct. Université Strasbourg (1949)
- (32) Harden y Young, J.Chem.Soc. 21, 189 (1905)
- (33) Herriek, H.T., Hellbach R. y May O.E., Ind.Eng.Chem.
27, 681-683 (1935)
- (34) Hixson A.W. y Gaden E.L., Ind.Eng.Chem. 42, 1792-1801 (1950)
- (35) Hopkins E.F. Agr.Exp.Sta.Mem. 151 (1934)
- (36) Kane, J.H., Finlay A., Amann P., F., Patent USA 2327191 (1943)
- (37) Krew E.O., Waksman S.A., Ind.Eng.Chem. 821 (1947)
- (38) Kluyver A.J. y Perquin L.H., Biochem.Z. 266, 68-81 (1933)
- (39) Knoop. Klin.Wochs. 2, 60-63 (1923)
- (40) Kornberg H.L., Krebs H.A., Nature, 179, 988-991 (1957)
- (41) Kornberg H.L., Madsen N.B., Biochem.J. 66, n° 2, 13p (1957)
- (42) Kornberg H.L., Beavers H., Nature, 180, 35-36 (1957)
- (43) Kornberg H.L., Biochem.J. (en prensa)
- (44) Krebs H.A., Gurin S., Eggleston L.V., Biochem.J. 51, 614
(1952)

- (45) Krebs, H.A. y colabora. Biochem. J. 51, 614 (1952)
- (46) Kun y García-Hernández, Biochem. and Biophys. Acta, 23, 181 (1957)
- (47) Lepierre G., Compt. rend. 156, 258 (1913)
- (48) Lipmann, Adv. in Enzymol. I, 99 (1941)
- (49) Lockwood, L.B., Ward, G.E. y May O.E., Zbt. Abt. IX, 90, 411-425 (1934)
- (50) Lockwood, L.B., Ward G.E. y May O.E., J. Agr. Res. 53, 849-857 (1936)
- (51) Lugg y Overall, Australian J. Sc. Res. 1, 98 (1948)
- (52) Mann, Biochem. J. 38, 339-345 (1944)
- (53) Mac Hargue y Calfee, R.H., Botan. Gaz. 91, 183-193 (1931)
- (54) Miksch, J., Rauch J., Mielke-Miksch R., Bernhauer K., Biochem. Z. 320, 398-401 (1950)
- (55) Melliard, M., Compt. rend. 189, 417-420 (1929)
- (56) Niethammer, A., Biochem. Z. 184, 370-382 (1927)
- (57) Nord y Hall, Adv in Enzymol. V, 163-203 (1945)
- (58) Ochoa, S., Stern, J.K. y Schneider M.C., J. Biol. Chem. 193, 690 (1951)
- (59) Olmsted, A., Z. Physik. Chem. A. 144, 49 (1929)
- (60) Olson, Nature, 174, 695 (1954)
- (61) Pfeffer, W. Jahrb. wiss. Botan. 28, 203-268 (1895)
- (62) Porras K. y Garrido J.M., Rev Cien, Aplie. 56, 221-228 (1957)
- (63) Raistrick, H. y Simonart P. Biochem J., 27, 628-633 (1933)
- (64) Raulin, J. Ann. Sci. Nat. Ser. V bot., 11, 93-299 (1869)
- (65) Roberg H., Zent. Bakt. Parasitenk. 74, 333-371 (1928)
- (66) Roth, H.G., Lively D.H. y Hodge H.W., J. Bact. 69, n° 4, 455-459 (1955)
- (67) Saavedra I. y Garrido J.M., Comun. V Jorn. Biogén. Latinas (19

- (68) Semeniuk, Iowa State Col. Z.Sci. 18, 325-338 (1944)
- (69) Shaffer y Semogyi, J.Biol. Chem. 100, 695 (1933)
- (70) Shu, P. y Johnson W.J., Ind.Eng. Chem. 40,nº 7, 1202 (1940)
- (71) Shu, P., J.Agr.Food Chem. 1, 1119-1123 (1953)
- (72) Sisonart y Yu Chow, Antoine Leeuwenhoek, J.Microb.Serol. 20, 174-180 (1954)
- (73) Skinner, C.G., J.Bact. 28, 95-106 (1924)
- (74) Smith, R.A. y Gunsalus I.C., Nature, 175, 774 (1955)
- (75) Smith, R.A. y Gunsalus I.C., J.Biol. Chem. 229, 305 (1937)
- (76) Steinberg, R.A., Am.J.Botany 6, 330-372 (1919)
- (77) Steinberg R.A., J.Agr. Research, 51, 413-424 (1935)
- (78) Steinberg, R.A., Am.J.Botany 6, 330-372 (1919)
- (79) Stokes, J.L. y Gunness, M. J.Bact. 52, 195-207 (1946)
- (80) Sumiki, Y., Bull Agr.Chem.Soc.Japan, 5, 10-13, 13-15 (1929)
- (81) Sumiki Y., Bull Agr.Chem.Soc.Japan, 7, 62-63 (1931)
- (82) Sykora y Prehaska, Chem Listy 47, 1674 (1953)
- (83) Takahashi T. y Sakaguchi K., J.Agr.Chem.Soc.Japan 1, 344, (1925)
- (84) Takahashi T. y Asai T., Zentr. Bakt.Parasitenk. Abt. II 89, 81-84 (1933)
- (85) Takata, R., J.Soc.Chem.Ind.Japan, 32, 243-244 (1929)
- (86) Takata, R. J.Soc.Chem.Ind.Japan 32, 245, (1929)
- (87) Thunberg, Skand.Arch.Physiol. 40, 1, 91, (1920)
- (88) Vinson, L.J., Cerecedo L.R., Bull R.P. y Nord F.F. Science, 101, 388-389 (1945)
- (89) Wakeman S.A. y Foster J.V. Compt.rend.Ac. Sc. 483-486 (1938)

- (90) Waksman S.A. Patent USA 2326986 (1943)
- (91) Vassiljew, G., Biochem.Z. 278, 226-234 (1935)
- (92) Wehner, C. Ber. 51, 1663-1668 (1918)
- (93) Wehner, C. Biochem.Z. 197, 418-431 (1928)
- (94) Wehner, C. citado en Koberg en 1928 (1893)
- (95) Wells, P.A., Moyer, A.J., Stubbs, J.J. Herriek, R.T. y May O:
Ind. Eng. Chem. 29, 653-656 (1937)
- (96) Wise, W.S., J. Gen. Microbiol. 5, 167-177 (1951)
- (97) Wong, D.T.O. y Aji S.J., J. Amer. Chem Soc. 78, 3230 (1956)
- (98) Wood T y Bender, E., Biochem. J., 67, 366-373 (1957)